

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

EXPÉRIENCES D'INTERCROISEMENT DE GLOSSINES (TSÉ-TSÉS) DU GROUPE *GL. PALPALIS*, EFFECTUÉES A L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

par E. ROUBAUD (*).

(Institut Pasteur.)

Les plus anciennes tentatives d'hybridation entre les glossines paraissent avoir été réalisées par Kleine (1909) qui a cherché, sans y réussir, à obtenir le croisement de *palpalis fuscipes* (Newstead) avec *Gl. morsitans*, au Tanganyika. A peu près vers la même époque, en 1910-1911, j'avais tenté, de même sans succès, au Dahomey, d'effectuer des croisements interspécifiques entre les différentes espèces de glossines locales, se rencontrant dans les mêmes stations.

Ces expériences, en raison de leurs résultats négatifs, sont demeurées inédites.

Je me bornerai ici à signaler qu'en aucun cas je n'ai réussi à obtenir d'hybrides, ni même de véritables accouplements entre *Gl. tachinoides* ♂♂ et *Gl. longipalpis* ♀ (une femelle étant placée avec de nombreux mâles), entre *palpalis* ♂ et *Gl. longipalpis* ♀, de même qu'entre *Gl. morsitans* et *tachinoides*, dans un sens ou dans l'autre des croisements.

En plaçant simultanément dans la même cage, en étroit contact, *palpalis* ♂ - ♀, *tachinoides* ♂ - ♀ et *Gl. longipalpis*, aucune tentative d'accouplement croisé ou interspécifique ne fut constatée,

(*) Manuscrit reçu le 8 juillet 1953.

tandis que les accouplements homologues étaient immédiatement observés, les conjoints de même espèce s'unissant d'une façon sélective immédiate. A ce sujet, je noterai que si *Gl. morsitans* (*submorsitans*) s'accouple et se reproduit aisément en petit espace, les accouplements intraspécifiques sont difficilement observés, dans ces conditions, pour *Gl. longipalpis* qui se manifeste comme plus eurygame que la première. Cette différence essentielle de comportement permettrait à elle seule de distinguer, en tant qu'espèce, ces deux formes si voisines.

L'intérêt d'une étude approfondie des hybridations et des fécondations intra- ou interspécifiques chez les glossines, au laboratoire comme dans la nature, est aujourd'hui bien apparent. Le problème a fait l'objet, dans ces dernières années, de recherches remarquablement suggestives et intéressantes, de la part notamment de Corson (1932), de Potts (1937-1940-1944), de Jackson (1945-1946) et surtout de Vanderplank (1944-1945-1947-1948, etc.). Je ne puis m'étendre ici sur les multiples résultats qui se dégagent de ces études. Je dirai seulement que ce dernier auteur a su donner à la question toute son ampleur, montrant que si les possibilités d'hybridation existent entre espèces ou sous-espèces ou même entre groupes de glossines, elles sont considérablement réduites par des barrières diverses d'amixie, pouvant intervenir comme facteurs de réduction spontanée ou de limitation des espèces. Les importantes notions qui résultent de ces travaux offrent ainsi un intérêt non seulement théorique, mais pratique. Il semblerait permis d'envisager, avec les auteurs anglais précités, que la lutte contre les tsé-tsés puisse, dans certains cas, s'appuyer sur ces facteurs amixiques d'hybridation ou d'interférences biologiques, susceptibles de contribuer à la stérilisation des formes concurrentes dans une station donnée. Ce sont là des notions dont il est nécessaire de bien se représenter la valeur.

D'un autre côté, l'étude des réactions au croisement entre les différentes espèces permet d'apporter des bases sérieuses à la Classification, en appuyant ou infirmant les distinctions établies, du point de vue morphologique, entre les espèces ou sous-espèces diverses de tsé-tsés, proposées jusqu'ici par la Systématique pure. Il faut y voir un rigoureux moyen biologique de contrôle de la valeur des bases de cette dernière. C'est en particulier à ce critère que j'ai fait récemment appel (1952) pour apprécier la signification, en tant que race génétiquement individualisée, de la *Gl. palpalis* à teinte sombre des palétuviers du Cameroun, la coloration seule ne pouvant être admise comme élément stable de différenciation de cette variété d'avec la *Gl. palpalis palpalis* habituelle.

Les recherches qui font l'objet du présent travail ont pour objet de verser aux débats, dans ces ordres d'idées, les résultats que

j'ai pu obtenir en tentant, à Paris même, l'hybridation de deux formes du groupe de *Gl. palpalis* (1). L'une de ces formes n'est autre que la sous-espèce typique *Gl. palpalis palpalis* Rob. Desv. dont les caractères distinctifs basés sur les détails de l'hypopyge et des plaques anales sont bien connus classiquement. F. Zumpt a clairement exprimé et figuré ces caractères dans son bel ouvrage sur les glossines (1935). La souche de *Gl. palpalis palpalis*, originaire de la région de Yaoundé (Cameroun français), qui a été utilisée pour les recherches que je présente ici, est bien conforme aux particularités morphologiques figurées par l'auteur. L'apophyse basilaire externe des gonopodes est médiocrement saillante et de contour arrondi ; la forme en jambe du clasper (g.) est bien caractéristique. Chez les femelles, les plaques dorsales (p d) sont dépourvues de soies à l'angle interne (V. fig. 3).

L'autre forme étudiée appartient au type également classique de *palpalis fuscipes* Newstead 1910. Cependant, notre souche qui est originaire de la région de Brazzaville se montre un peu différente de la *fuscipes* type de Newstead, si l'on se réfère aux figures données par Zumpt. Les différences portent principalement sur les paramères (gonopodes), très velus à leur base et dont l'extrémité du crochet ne s'incurve pas régulièrement, comme dans la *fuscipes* type, mais en angle brusque pourvu de plusieurs soies raides à son coude du côté externe ; il n'existe pas de saillie externe comme chez *martinii*. L'apophyse a des gonopodes est forte (V. fig. 2). Les plaques anales dorsales de l'appareil femelle sont pourvues de soies fortes à leur angle interne.

Selon M. A. de Barros-Machado qui a eu la grande obligeance de revoir mes spécimens d'élevage, la *fuscipes* de Brazzaville et régions limitrophes doit être rapportée à la sous-espèce géographique *fuscipes quanzensis* Pires 1948, qui a été décrite de l'Angola (rio-Quanza). Cette forme avait été distinguée déjà comme une forme de *Gl. palpalis* par Patton (1930) et considérée par Zumpt (1933) comme une *fuscipes* atypique. L. Vanderplank (1949) décrit également comme « forme intermédiaire » de *palpalis* la mouche de Léopoldville. Il donne une figure des paramères très velues à la base qui est superposable à celle de notre forme.

L'existence dans la région de Brazzaville de cette variété a été bien reconnue par L. Maillot, qui la mentionne sous le terme de *fuscipes* race Brazzaville, dans ses premiers travaux (Rapport annuel 1951) puis de *fuscipes quanzensis* (1953) ou de variété de Brazzaville. J'ajoute qu'elle y est présente depuis longtemps,

(1) Je dois ces souches à la grande obligeance de MM. les D^{rs} L. Maillot de l'Institut d'Etudes Centrafricaines, et J. Rageau de l'Office de la Recherche Scientifique Outre-Mer, qui ont bien voulu m'adresser, à l'Institut Pasteur, des mouches vivantes de leurs élevages africains respectifs, à Brazzaville et Yaoundé.

puisque c'est à cette sous-espèce qu'appartiennent, ainsi que j'ai pu m'en assurer par l'examen de spécimens, les *Gl. palpalis* recueillies par la mission française G. Martin, A. Leboeuf et E. Roubaud, en 1906-1908 et qui figurent dans les Collections de l'Institut Pasteur. C'est à cette mouche qu'il convient de rapporter les travaux que j'ai poursuivis au Congo français, à cette époque, sur *Gl. palpalis* et en particulier mon mémoire inaugural de 1909 sur la biologie et le rôle dans l'étiologie des trypanosomiasés de cet insecte. Il est donc important de pouvoir aujourd'hui préciser l'identification de la mouche de Brazzaville et de la confronter, par la voie biologique des intercroisements, avec la *palpalis palpalis* typique.

Mes expériences actuelles, poursuivies à Paris, peuvent être considérées comme étendant légèrement le champ des investigations actuellement publiées sur les hybridations inter-raciales dans le groupe de *palpalis*, dont on trouvera un substantiel résumé dans le travail de F. L. Vanderplank, de 1948. Les recherches antérieures relatées par cet auteur ont porté sur trois sous-espèces ou races de *palpalis* : *fuscipes* type, *martinii* et *palpalis palpalis* proprement dite. J'en résumerai ci-après les principaux résultats.

En ce qui concerne le mélange possible de ces différentes formes, l'un des faits les plus frappants signalés et étudiés par Vanderplank (1944-1948) concerne la mortalité résultant, dans beaucoup de cas, chez les femelles, de ces intercroisements. Si, en effet, des hybridations ont pu être obtenues entre les trois sous-espèces énumérées du groupe de *palpalis*, dans bien des cas ces accouplements croisés se terminent par la mort de la femelle. Une terminaison mortelle serait quasi la règle dans le cas des accouplements entre ♂ *martinii* et ♀ *fuscipes* type. La mort serait due au fait que les crochets supérieurs de l'armature du mâle (cerques), plus développés chez *martinii* que chez *fuscipes*, blesseraient l'abdomen de la femelle. Les mâles *palpalis* ont normalement les crochets terminaux des cerques moins développés que ceux des ♂ *fuscipes* ; cependant ils tuent également nombre de femelles de *fuscipes* avec lesquelles ils s'accouplent ; la structure différentes des paramères peut être aussi en cause dans cette action nocive.

Il arrive que lorsque les mâles *martinii* obtenus en élevage sont de taille plus réduite, leurs cerques sont également de dimensions plus faibles, mais ils n'en ont pas moins causé la mort des femelles de *fuscipes*. S'il se produit que dans des accouplements de brève durée la femelle ne soit pas lésée, il a été reconnu que d'ordinaire c'est qu'elle n'est pas fécondée par le ♂ *martinii*.

Après résection de l'extrémité aiguë des cerques chez les mâles, des hybrides ont pu être expérimentalement obtenus dans les deux sens. Toutefois, le nombre des femelles ayant pu produire des

pupes au cours des croisements entre *palpalis* et *fuscipes* ou *martinii* et *fuscipes* a toujours été très faible. L'obtention des hybrides dans ces croisements, de même que dans les croisements interspécifiques ou intergroupes des autres espèces de glossines, est donc soumise à d'importants aléas. Non seulement elle peut être entravée par suite des dommages résultant de l'accouplement, mais aussi du fait d'autres barrières naturelles s'opposant plus ou moins au mélange des formes, telles que le défaut d'insémination, le manque de fertilisation des femelles, etc.

Les hybrides qui ont pu être obtenus à la suite des intercroisements, préparés artificiellement, des trois sous-espèces énumérées de *Gl. palpalis* ont été croisés entre eux et leurs parents. Dans la plupart des cas, les ♂ hybrides F¹ n'ont pu féconder les femelles à cause des incompatibilités morphologiques de leurs armatures génitales. Dans les cas où l'on a pu réséquer les extrémités des cerques, la fertilité des mâles hybrides a été constatée. Les femelles, dans les rares cas où elles ont pu être accouplées avec succès, se sont aussi montrées fertiles, même en F².

Telles sont, dans leur ensemble très général, les constatations précédemment rapportées par les auteurs précités. Elles autorisent à considérer les trois sous-espèces en cause comme présentant une individualité relative qui est garantie par différentes barrières d'amixie, bien qu'en théorie l'hybridation demeure possible entre elles. J'ajouterai enfin que L. Maillot, dans son étude récente (1953) de variétés de *Gl. palpalis* présentes en Afrique Equatoriale Française, mentionne avoir inutilement tenté, à l'Institut Pasteur de Brazzaville, en 1948, des intercroisements entre *Gl. palpalis fuscipes quanzensis* et *Gl. palpalis palpalis*.

J'exposerai ci-après les résultats qui peuvent être dégagés de mes propres expériences.

EXPÉRIENCES D'INTERCROISEMENT ENTRE *Gl. palpalis palpalis*
(ORIGINE YAOUNDÉ, CAMEROUN FRANÇAIS)
ET *Gl. palpalis fuscipes* VAR. *quanzensis*, SOUCHE BRAZZAVILLE.

En fin d'octobre et début de novembre 1951, plusieurs essais d'intercroisement dans les deux sens ont été effectués entre les deux souches indiquées de *Glossina palpalis* R. Desv. provenant de nos élevages de l'Institut Pasteur de Paris. Selon notre technique habituelle, les mouches étaient maintenues en thermostat réglé à 25° C et 90 p. 100 environ de H. R., en cagettes Roubaud.

I. — INTERCROISEMENT DE ♂ *Gl. palpalis palpalis* YAOUNDÉ
ET ♀ *fuscipes* BRAZZAVILLE.

Le 9 novembre 1951, une ♀ de souche Brazzaville, née ce jour, est mise dans une cagette en présence de trois ♂♂♂ nouvellement éclos,

de souche *palpalis-palpalis* Yaoundé. L'accouplement est observé le lendemain.

Le 12 novembre sont ajoutées trois autres ♀ ♀ ♀ de souche Brazzaville, nées dans la matinée. Ces mouches nouvellement écloses ne sont introduites avec les mâles qu'en fin d'après-midi, afin de laisser à leurs téguments le temps de se durcir et d'éviter ainsi des déformations anormales ou des lésions mécaniques toujours possibles dans les accouplements trop précoces.

Le 16 novembre, dans l'après-midi, sont encore introduits dans la cage une cinquième ♀ de souche Brazzaville et un quatrième ♂ de Yaoundé, tous deux nés dans la matinée. Des accouplements sont fréquemment observés, entre les divers occupants de la cage.

Le 5 décembre et le 10 décembre, on note la mort, en condition non gravis, de deux des femelles. Cette mortalité précoce peut être interprétée comme résultant de dommages subis par suite de l'accouplement inadapté, au sens de Vanderplank, mais les trois autres femelles ont bien résisté à ces influences mortelles. A la date du 27 décembre 1951, restent à l'état vivant, en présence, deux ♂ ♂ Yaoundé et trois ♀ ♀ ♀ de souche Brazzaville.

RÉSULTATS DU CROISEMENT. — Pendant la période initiale de l'expérience allant du 9 novembre au 27 décembre (quarante-huit jours), aucune production de larve n'a été constatée, malgré des accouplements multiples. Les deux ♀ ♀ qui succombèrent dans le cours de cette période ne manifestèrent pas d'apparences de fertilisation. Ultérieurement, pendant l'intervalle de temps allant du 27 décembre 1951 au 18 février 1952 (cinquante-trois jours), six pupes hybrides furent successivement produites, par l'ensemble des trois femelles restantes. Une d'entre elles, morte le 7 janvier 1952, fut, d'autre part, reconnue en état de gestation, porteuse d'une petite larve dans l'utérus.

A la date du 2 février 1952, le dernier des ♂ ♂ meurt ; il ne reste plus dans la cage qu'une femelle vivante. Celle-ci a produit sa dernière puce le 18 novembre.

La femelle, demeurée sans ♂ depuis le 11 novembre, meurt le 15 mars, sans avoir produit d'autres larves. A la dissection, qui fut effectuée alors que la ♀ était mourante, aucun spermatozoïde actif ne fut constaté dans les voies génitales ; l'utérus était vide de larve et un œuf mûr se montrait bloqué dans l'ovaire droit (fig. 1). Nous reviendrons plus loin sur la signification biologique de ces constatations diverses qui témoignent, dans leur ensemble, d'une résistance certaine à la fécondation croisée.

DESTINÉE DES HYBRIDES ♂ *palpalis palpalis* YAOUNDÉ × ♀ *palpalis fuscipes* BRAZZAVILLE. — Le croisement ci-dessus a permis d'obtenir, des pupes précédentes, six imagos hybrides F¹, en apparence normalement conformés. Deux appartenaient au sexe ♂, les quatre autres étaient des femelles.

Pourtant, de ces six mouches, aucun descendant hybride de deuxième génération ne put être obtenu, les femelles ayant été accouplées, soit avec des ♂♂ hybrides, soit avec des ♂♂ de souche pure, ainsi qu'en témoignent les expériences suivantes :

1° Une femelle hybride F¹, née le 14 janvier 1952, d'une puppe formée le 27 décembre (on notera le délai exceptionnellement bref de dix-huit jours de pupaison), est morte le lendemain après s'être normalement gorgée de sang.

2° Une deuxième femelle hybride F¹, née le 4 février, d'une puppe formée le 7 janvier a été accouplée ce jour avec un ♂ hybride né

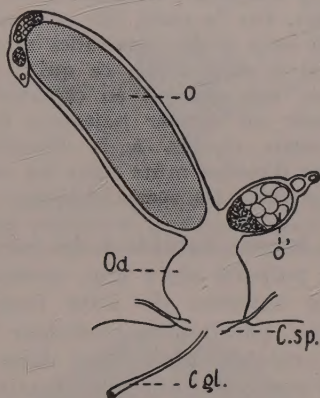


FIG. 1. — État des ovaires de la femelle à sa mort, quatre mois environ après sa dernière ponte hybride; o' : ovaires; Od : oviducte; c.sp. : conduits des spermatèques. Un œuf mûr non fécondé bloque l'ovaire droit : o.

le 28 janvier et demeuré isolé depuis sa naissance. L'accouplement s'est produit aussitôt ; mais la femelle est morte paralysée le lendemain, sans avoir pu parvenir à se gorger de sang.

On peut se demander si la mort prématurée de ces deux femelles hybrides (1 et 2) n'aurait pas eu pour cause des lésions mécaniques résultant de l'accouplement avec le ♂ hybride, comme en signale Vanderplank (1948), notamment dans les intercroses de ♂♂ *palpalis fuscipes* et ♀ *Gl. palpalis palpalis*. Les grands claspers des ♂♂ hétérologues blesseraient fortement les femelles de *palpalis*. En faveur de cette interprétation plaiderait le fait que le ♂ avait les caractères de *fuscipes* quant à la forme des crochets des gonopodes et d'autre part qu'une jeune femelle de souche pure Brazzaville, accouplée le 23 novembre, avec ce mâle

hybride F¹ des expériences 1 et 2, est morte également le lendemain de son accouplement, sans avoir pu prendre de sang.

3° Une troisième femelle hybride F¹, née le 12 février d'une puppe formée le 15 janvier, est placée, le 14 février, avec le ♂ hybride du 28 janvier. Cette femelle, qui s'est gorgée avec difficulté, meurt également de façon précoce, le 18 février, et sa mort pourrait encore être rapportée à des lésions d'accouplement, déterminées par la conformation de l'hypopyge du ♂ hybride à caractère maternel *fuscipes* (voir plus loin).

4° La quatrième femelle hybride F¹, née le 25 février d'une puppe obtenue le 26 janvier, est placée, le 27 février, avec un ♂ *palpalis-palpalis* Yaoundé de souche pure (deuxième génération au laboratoire). Après un accouplement immédiat, la mouche se gorge fortement de sang humain le 8 mars. Par la suite, elle se comporte normalement, répétant ses prises de sang à des intervalles réguliers. Cette femelle a pu atteindre environ 4 mois d'âge, ce qui représente une longévité assez avancée pour une glossine en captivité. Elle est morte le 22 juin 1952 sans avoir pu donner naissance à aucun descendant, malgré des accouplements répétés. A la dissection, la stérilité fut confirmée par l'absence d'ovules mûrs dans les ovaires et de spermatozoïdes reconnaissables dans les spermathèques.

La survie de cette femelle hybride à des accouplements répétés avec un ♂ *palpalis palpalis* alors que, comme nous allons l'indiquer, les caractères externes de cette femelle se montraient homologues à ce type, paraît bien confirmer l'interprétation des résultats mortels constatés plus haut dans les accouplements croisés hétérologues avec ♂♂ du type *fuscipes* Brazzaville.

En conclusion, on voit qu'il n'a pas été possible d'obtenir une deuxième génération de ces hybrides F¹ ♂ *palpalis palpalis* Yaoundé × ♀ *palpalis fuscipes* Brazzaville.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES DES HYBRIDES F¹ ♂ *palpalis palpalis* × ♀ *fuscipes-quanzensis*. — Ainsi que le montrent les figures 2 et 3, les hybrides ♂ ont présenté les caractéristiques morphologiques maternelles (*fuscipes*), et les femelles les caractères paternels (*palpalis palpalis*). On trouve là, par conséquent, une manifestation curieuse et inattendue d'hérédité liée au sexe qu'il est intéressant de mettre en évidence. F. L. VANDERPLANK (1949) constate, de même, pour le croisement inverse ♂ *fuscipes* × ♀ *palpalis*, que les paramères sont, chez les hybrides ♂ obtenus, semblables à ceux de *palpalis* dans leur forme et leur structure. Il y aurait donc là aussi hérédité du type maternel chez les mâles.

Comme le montre l'exemple de la femelle hybride n° 4, ci-dessus, l'hérédité des caractères paternels semble avoir garanti cette hybride des effets mortels de l'accouplement observés dans tous les cas précédents où le ♂, homologue ou non, présentait les caractéristiques morphologiques de *fuscipes*.

Notons ici que dans les intercroisements *morsitans* × *swynnertoni* Corson mentionne la *dominance* des caractères *morsitans*,



FIG. 2. — Détails de l'hypopygie chez les hybrides ♂ F1, obtenus de l'intercroisement ♂ *palpalis palpalis* et ♀ *fuscipes quanzensis*; g : clasper; a : apophyse basilaire externe fortement saillante, caractéristique du type *fuscipes*.

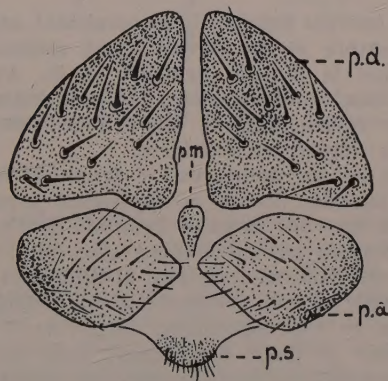


FIG. 3. — Plaques de l'armement génital chez une ♀ hybride F1 obtenue par intercroisement de ♂ *palpalis palpalis* et de ♀ *fuscipes quanzensis*; p.d. : plaques dorsales, p.a. : plaques anales, p.m. : plaque médiane. L'angle interne dépourvu de soies des plaques dorsales est caractéristique du type *palpalis palpalis*.

tandis que pour Vanderplank (1945), tous les hybrides, mâles ou femelles, sont du type *swynnertoni*. L'hérédité liée au sexe n'est pas ici en cause.

II. — ESSAIS D'INTERCROISEMENT DE ♂♂ *fuscipes quanzensis* BRAZZAVILLE × ♀ *palpalis palpalis* YAOUNDÉ.

Différents essais ont été réalisés pour obtenir des intercroisements inverses entre ♂ *fuscipes* Brazzaville et ♀ *palpalis palpalis* de Yaoundé. Tous ces essais, qui sont énumérés ci-après, sont demeurés stériles.

Premier essai : Le 9 novembre 1951, trois ♂♂ nouvellement éclos de la souche de Brazzaville sont mis en présence d'une ♀ *palpalis palpalis* de Yaoundé, éclosée dans la matinée. Cette femelle meurt le 11, avec l'extrémité vulvaire déformée, ce qui paraît imputable, comme plus haut signalé, aux effets mécaniques d'accouplement avec les ♂♂ *fuscipes quanzensis*.

Le 12 novembre 1951, deux nouvelles ♀♀ *palpalis palpalis* de Yaoundé, nées depuis vingt-quatre heures, sont placées avec les trois ♂♂ *fuscipes* de Brazzaville ci-dessus. Le 13, on en ajoute encore une troisième. Les trois femelles sont immédiatement saisies par les ♂♂.

Le 16 novembre, deux des femelles sont trouvées mortes en accouplement, ce qui confirme encore la thèse de l'influence préjudiciable des claspers de *fuscipes* sur les ♀ *palpalis*. Pourtant la troisième femelle a résisté à ces accouplements mortels ; maintenue en présence des trois mâles *fuscipes* Brazzaville, pendant plusieurs semaines, elle s'est accouplée nombre de fois, sans qu'aucune influence préjudiciable en soit résultée.

Les trois ♂♂ *fuscipes* Brazzaville disparaissent successivement dans le courant de décembre et de janvier. C'est seulement à partir du 16 janvier 1952, que la femelle demeure seule. Au cours de cette période d'environ deux mois, où elle a été maintenue en permanence en contact avec les mâles *fuscipes*, elle n'a manifesté aucune entrée en gestation et n'a déposé aucune larve.

Le 15 mars 1952, on lui donne un ♂ jeune de souche homologue *palpalis palpalis* Yaoundé. Aucun accouplement n'est observé. Retiré le 18 mars et placé avec des femelles Yaoundé de l'élevage général, le ♂ homologue s'accouple immédiatement avec elles.

La femelle Yaoundé, trouvée accouplée à différentes reprises avec des ♂ *fuscipes* Brazzaville et qui a constamment résisté aux effets habituellement mortels de l'accouplement, meurt le 3 mai 1952, après environ quatre mois et demi d'existence, sans avoir pondu. A la dissection il n'est constaté aucune apparence de gestation et les *spermatheques* sont vides de *spermatozoïdes*. Il n'y a donc eu, malgré des accouplements réitérés, ni fertilisation, ni même simplement insémination positive.

Deuxième essai : Le 16 novembre 1951, un ♂ *fuscipes* Brazzaville, né de quelques heures, est placé avec une ♀ *palpalis palpalis* de Yaoundé, de même âge. Le lendemain, 17, on ajoute un deuxième couple : ♂ *fuscipes* Brazzaville-♀ Yaoundé, nouvellement éclos. Les accouplements sont observés pour les deux couples le 20 novembre. Les femelles semblent résister aux effets mortels de l'accouplement croisé.

Vingt-sept jours plus tard, le 13 décembre, est constatée la mort d'une des femelles Yaoundé. La dissection ne montre aucun début de gestation ; l'ovaire gauche renferme un ovule mûr, qui n'a pas quitté son ovariole (fig. 1) et n'est point descendu dans l'utérus. Cette rétention prolongée dans l'ovaire est comparable à celle que l'on observe chez les femelles non fécondées. Dans les spermathèques et les canaux, non plus que dans le reste du tractus génital, on ne trouve pas de spermatozoïdes actifs, mais seulement un amas granuleux, dû vraisemblablement à la décomposition sur place des éléments spermatiques.

La deuxième femelle de l'expérience a résisté beaucoup plus longtemps encore à l'intercroisement. Elle a été trouvée mourante le 29 janvier 1952, soit au soixante-treizième jour environ, après l'accou-

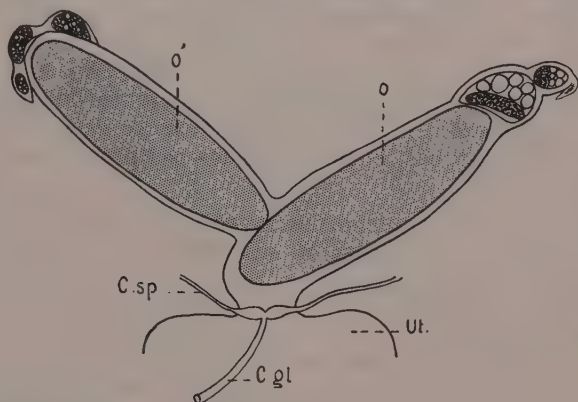


FIG. 4. — État des ovaires chez une ♀ *palpalis palpalis* au soixante-treizième jour après l'accouplement avec ♂ *fuscipes quanzensis*. Rétention des ovules mûrs *o* et *o'*.

plement avec le mâle hétérologue. Comme la précédente, cette femelle n'a jamais déposé de larve ; malgré des accouplements répétés, elle s'est comportée comme une femelle non fécondée. A la dissection, la femelle était encore animée de quelques mouvements ; on note dans chacun des ovaires, de chaque côté, un ovule mûr (fig. 4) traduisant un effet de rétention prolongé dans la gaine ovarique, comme nous l'avons fait connaître, autrefois, chez les femelles âgées non fécondées. Dans les spermathèques et les voies génitales, aucun spermatozoïde actif ni simplement reconnaissable n'a été mis en évidence.

En résumé, au cours de ces deux essais d'intercroisement dans le sens ♂♂ *fuscipes* Brazzaville et ♀♀ *palpalis palpalis* Yaoundé, sur six femelles expérimentées, aucun hybride n'a pu être obtenu.

Trois des femelles sur six ayant subi l'accouplement avec les ♂♂♂ *fuscipes* sont mortes prématurément, traduisant une incompatibilité certaine d'ordre morphologique entre les deux formes.

Pourtant les trois autres femelles ont résisté à des accouplements répétés avec les mâles *fuscipes* et deux d'entre elles au moins ont pu atteindre un âge avancé. Cependant, malgré des accouplements réitérés pendant de nombreuses semaines, ces femelles se sont comportées comme non fécondées, ainsi qu'en a témoigné l'examen de l'appareil génital, montrant l'absence de spermatozoïdes vivants dans les canaux et les spermathèques et le blocage des ovules mûrs dans les ovaires (fig. 4).

En dehors des essais d'intercroisement exposés en I et II, trois autres, qui n'ont point donné de résultats, ont été également tentés. En particulier, je mentionnerai que le 20 mars un ♂ *fuscipes* de Brazzaville et une femelle *palpalis* de Douala, réunis dans la même cage se sont accouplés aussitôt. Ces deux glossines sont demeurées ensemble pendant plus d'un mois. A la mort de la ♀, survenue le 19 mai 1950, aucune apparence de gestation, ni même de fertilisation, n'a été décelée. *Absence de spermatozoïdes* dans les spermathèques, comme dans les cas précédents.

III. — ESSAIS D'INTERCROISEMENT PAR JEU DES PRÉFÉRENCES PSYCHIQUES OU SENSORIELLES.

Dans les différentes tentatives d'intercroisement dans les deux sens, entre *palpalis palpalis* et *fuscipes quanzensis*, énumérées ci-dessus, des ♀♀ d'une souche unique ayant été offertes aux ♂♂, la notion du choix entre les deux conjoints n'a pas eu à intervenir ; d'autres expériences ont été également effectuées afin de tenter de mettre en valeur les préférences éventuelles, d'ordre psychique ou sensoriel, pouvant être manifestées par les mâles ou les femelles, envers le représentant homologue ou hétérologue du sexe opposé. On pouvait espérer déceler ainsi l'existence possible d'un facteur d'isolement ou d'amixie, d'ordre psychique ou sensoriel, de nature à séparer dans la nature les deux types de glossines et à contrarier leurs mélanges possibles.

Ces expériences, bien que réalisées en captivité, dans les petites cages où furent mis en contact simultanément mâles et femelles de type différent, permettent au moins d'affirmer qu'il n'existe pas, en principe, de barrière d'ordre psychique entravant l'hybridation des deux formes, si elles se trouvent placées dans le même environnement (2).

(2) Dans la nature, la question se compliquerait sans doute des préférences possibles marquées par les deux formes pour des stations ou gîtes microclimatiquement et localement distincts, ce qui annulerait ou réduirait à l'extrême les possibilités d'hybridation, en réalisant des barrières géographiques réelles entre elles, dans les zones de confluence.

a) Le 5 janvier 1952, un ♂ de souche *fuscipes* Brazzaville, né au laboratoire le 3 janvier, est placé en cagette Roubaud, simultanément avec une ♀ de même souche et une ♀ *palpalis palpalis* de souche Yaoundé. Ces deux femelles étant âgées déjà de plus de 1 mois et ayant déjà subi le contact des mâles, dans leurs élevages respectifs, ne sont pas recherchées par le ♂ Brazzaville et aucune tentative d'accouplement n'est observée, soit avec la ♀ homologue, soit avec l'autre.

Deux jours plus tard, le 7 janvier, le même mâle *fuscipes* Brazzaville est remis en contact avec la ♀ homologue ancienne ci-dessus et une ♀ vierge *palpalis palpalis* née la veille. Après repas de sang simultané des trois mouches, la ♀ *palpalis palpalis* est immédiatement choisie par le ♂, qui s'accouple avec elle aussitôt, délaissant complètement la ♀ homologue.

L'âge des femelles ainsi que leurs conditions physiologiques étant différents, les résultats ne semblèrent pas démonstratifs. On pouvait penser que la préférence manifestée par le ♀ *fuscipes* Brazzaville pour la ♀ *palpalis palpalis* Yaoundé était liée au jeune âge et à l'état de non-fécondation de cette femelle, tandis que la ♀ homologue était plus âgée et vraisemblablement déjà fertilisée. Aussi l'expérience a-t-elle été reprise en mettant en présence, le 9 janvier 1952, le même ♂ de souche Brazzaville, la ♀ jeune *palpalis palpalis* précédente, déjà accouplée avec ce mâle les 7 et 8 janvier et une ♀ jeune de souche Brazzaville, née la veille et non fécondée.

Les trois mouches étant marquées afin de pouvoir les différencier, ont été mises à piquer sur un cobaye. On constate qu'aussitôt après la prise de sang par la femelle jeune de Brazzaville, le ♂ vole directement vers elle et s'accouple, dédaignant, cette fois, la ♀ *palpalis palpalis* hétérologue plus âgée.

Ces premiers essais ne permettent guère qu'une conclusion c'est que les préférences du mâle vont d'abord aux femelles jeunes, non fertilisées encore, qu'elles soient de même souche ou de souche hétérologue. Le facteur qui guide les mâles dans leurs préférences est d'ordre sensoriel et leur choix est orienté avant tout par l'âge et l'état physiologique des femelles, non par leur nature raciale.

Quant à ces dernières, elles semblent se comporter d'une façon strictement passive dans les expériences précitées.

b) L'expérience ci-après confirme ces points de vue. Le 11 janvier 1952, un jeune ♂ *palpalis palpalis* Yaoundé, né de la veille, est mis en présence, comme précédemment, après repas de sang, avec une femelle de même souche Yaoundé provenant de l'élevage général, âgée de 8 jours et déjà fécondée, et d'une jeune femelle de souche *fuscipes* Brazzaville, née le 8 janvier et n'ayant pas encore subi l'approche d'un ♂. Les trois mouches en présence sont différenciées par des marques.

Aucun accouplement n'ayant été observé au cours de la journée du 11 janvier, le ♂ *fuscipes* est retiré. Replacé le lendemain 12 janvier, avec les deux mêmes femelles, le ♂ prononce une courte tentative

d'accouplement avec la ♀ de souche homologue, puis demeure au repos. Il est retiré de la cage vers le soir.

Le 14 janvier, après un isolement d'une quarantaine d'heures, le ♂ *fuscipes* Brazzaville est à nouveau gorgé de sang et replacé avec les deux femelles. Il délaisse complètement celle de même souche que lui, pour s'accoupler aussitôt avec la ♀ de souche hétérologue *palpalis palpalis*, plus jeune et non encore fécondée. A trois reprises différentes sont observés des accouplements croisés avec cette même femelle, au cours de la journée du 14. Dans la soirée du même jour, deux tentatives abortives d'accouplement sont cependant prononcées sur la ♀ de souche homologue *fuscipes*, sans qu'il y ait eu accouplement réel du ♂ avec cette femelle.

En résumé, les expériences *a* et *b* concordent pour faire ressortir que les libres préférences des ♂♂ *fuscipes* Brazzaville sont subordonnées à l'âge et au conditionnement physiologique des femelles. Elles sont indépendantes du type racial ou subsppécifique auquel celles-ci appartiennent. Le jeune âge et l'état de non fécondation des femelles constituent les conditions déterminantes de l'attirance des ♂♂ vers elles et des préférences qu'ils leur manifestent. Les femelles déjà âgées de quelques jours et ayant déjà subi l'emprise des mâles sont moins recherchées que les femelles vierges et très jeunes, quelle que soit la sous-espèce en cause. Vanderplank (1948) a souligné, de même, qu'expérimentalement *Gl. palpalis martinii* ♂ peut préférer *G. p. fuscipes* à sa propre espèce, tandis que *G. p. fuscipes* s'accouple facilement avec *Gl. palpalis palpalis*. Le même auteur (1947) a estimé que les femelles vierges ne sont plus attirantes pour les mâles, lorsqu'elles sont âgées de dix à vingt jours. Quant aux jeunes femelles elles ne résisteraient pas à l'accouplement durant la première ou la deuxième heure après l'éclosion, ou immédiatement après leur première ou leur seconde prise de sang.

Il est permis de dégager des faits exposés dans nos expériences, la notion qu'aucun obstacle d'ordre sensoriel ne s'oppose en principe à l'intercroisement des deux formes considérées, si des facteurs d'ordre biologique ou microclimatique ne réalisent pas dans la nature leur isolement géographique effectif.

DESTINÉE DES INTERCROISEMENTS ENTRE ♂♂ « FUSCIPES QUANZENSIS » et ♀♀ « PALPALIS PALPALIS » RÉALISÉS PAR CHOIX PRÉFÉRENTIEL DES MÂLES. — Dans les expériences *a* et *b* ci-dessus, le libre jeu des préférences a permis, comme on l'a vu, des accouplements croisés spontanés entre ♂ *fuscipes* souche Brazzaville et ♀ *palpalis* souche Yaoundé ; il est intéressant de comparer les résultats de ces tentatives spontanées d'intercroisement avec ceux précédemment exposés (parag. II).

Tout d'abord notons que des deux femelles *palpalis* qui ont été

choisies par les ♂♂ *fuscipes* dans les deux expériences, aucune n'a vu sa longévité compromise par l'accouplement avec le ♂ hétérologue, ainsi qu'il avait été parfois constaté dans les expériences des séries I et II ; les deux femelles ayant subi des accouplements répétés avec ♂ *fuscipes* ont survécu toutes les deux sans avoir supporté de dommages mécaniques résultant de leur intercroisement.

D'autre part, non seulement ces femelles ont survécu à leurs accouplements avec les ♂♂ *fuscipes*, mais elles ont toutes deux été fertilisées ; l'une d'entre elles, en effet, a pu, au cours d'une existence assez longue, donner naissance à des descendants hybrides viables, alors que dans les essais de la série II exposés plus haut, concernant le même sens d'intercroisement, aucune preuve de fertilisation des mouches survivantes n'avait été constatée. Il n'avait été obtenu de ces mouches aucune descendance, même abortive.

Les hybrides provenant de ces intercroisements préférentiels ont donné lieu aux constatations exposées ci-après.

EXPÉRIENCE a CI-DESSUS. — La femelle de souche *palpalis palpalis*, qui s'est longuement accouplée avec le ♂ *fuscipes* Brazzaville, les 7 et 8 janvier 1952, a résisté aux effets de l'accouplement interspécifique. Elle a mené à bien quatre gestations normales et quatre pontes successives qui eurent lieu respectivement les 25 janvier, 6 février, 15 février, 25 février. Cette femelle est morte le 10 mars 1952, sans nouvelle ponte.

Hybride n° 1 : La pupe du 25 janvier a donné naissance, le 25 février, à un imago femelle assez débile quoique extérieurement normalement développé. Cette ♀ hybride n'a pas été mise en présence du mâle ; elle est morte sans avoir pu réussir à se gorger de sang, quelques heures plus tard. L'examen des pièces de l'armure génitale permet de les rapporter avec certitude au type *palpalis palpalis* maternel (fig. 3).

Hybride n° 2 : La pupe n° 2, du 6 février a produit, le 4 mars, une femelle hybride vigoureuse et en apparence normalement constituée. Après s'être nourrie de sang le 5 mars, cette mouche a été placée avec un ♂ *palpalis palpalis* Yaoundé de deuxième génération d'élevage au laboratoire, qui est demeuré à peu près indifférent à son égard pendant les deux journées où il est demeuré à son contact, les 5 et 6 mars. Ce ♂ s'accouple immédiatement, au contraire, avec une femelle de souche homologue *palpalis palpalis* née le 5 mars, avec laquelle il a été placé, dans l'après-midi du 6.

Le lendemain, 7 mars, la femelle hybride F¹, qui a été refusée par le ♂ *palpalis palpalis* ci-dessus, est placée avec deux ♂♂ de souche *fuscipes* Brazzaville, nés récemment. L'accouplement a lieu immédiatement avec l'un des mâles, suivi d'un fort repas de sang sur cobaye. Les deux ♂♂ meurent le 9 mars. Ils sont remplacés au contact de la ♀ hybride par un autre ♂ de même souche, mais plus âgé, qui meurt le 14 mars 1952. A partir de cette date, la femelle hybride est demeurée sans mâle jusqu'à sa mort, survenue cinquante jours plus tard, le 5 mai. Au cours de son existence, qui a duré plus de deux

mois, cette femelle hybride n'a produit aucun descendant. A la dissection, elle a été reconnue stérile ; aucun spermatozoïde vivant n'a été décelé dans les spermathèques et leurs canaux.

Cette femelle, malgré son hérédité morphologique du type *palpalis palpalis* maternel, a cependant été préférée par les ♂♂ *fuscipes* et a parfaitement résisté aux effets de l'accouplement.

Hybride n° 3 : La pupe hybride n° 3, issue de ♂ *fuscipes* Brazzaville × ♀ *palpalis palpalis* Yaoundé, formée le 15 février 1952, a donné naissance le 15 mars à une femelle hybride F¹, apparemment bien développée, mais qui n'a pu parvenir à se nourrir de sang. Cette mouche est morte le 17 mars. L'examen des pièces de l'armature génitale l'a aussi caractérisée nettement comme du type maternel *palpalis palpalis*.

Hybride n° 4 : La dernière pupe hybride ♂ Brazzaville × ♀ Yaoundé, formée le 25 février, libère le 24 mars, également une femelle. Cette mouche, qui s'est gorgée facilement, dès les premières heures de son éclosion, a été placée le lendemain, 25 mars, avec un ♂ *palpalis palpalis* Yaoundé de troisième génération au laboratoire. Ce ♂ meurt le 23 mars ; la femelle hybride F¹ demeure sans mâle à partir de cette date. Elle meurt le 28 avril sans avoir donné naissance à aucun descendant.

En résumé, cet essai d'hybridation ♂ *fuscipes* × ♀ *palpalis palpalis* n'a produit cette fois que des femelles dont les caractères ressortissent nettement, comme précédemment, au type maternel. Aucune génération ultérieure n'a pu être obtenue de ces hybrides.

EXPÉRIENCE b. — Dans cet essai d'intercroisement préférentiel, un ♂ *palpalis palpalis* Yaoundé s'est accouplé franchement, à différentes reprises, avec une ♀ *fuscipes* Brazzaville, à partir du 14 janvier 1952. Cette femelle meurt le 7 février, sans avoir donné de descendance. A la dissection, on ne constate aucun début de gestation ; un ovule mûr est bloqué dans l'ovaire droit (fig. 1), traduisant l'état de stérilité de la femelle. Les spermatozoïdes ne sont pas reconnaissables dans les spermathèques et leurs canaux ; ils sont remplacés par un amas amorphe, granuleux. Pourtant, un paquet de spermatozoïdes vivants est visible au débouché d'un des canaux dans l'utérus ; il semble témoigner d'un accouplement récent : les éléments mâles ne sont pas perceptibles dans les parties plus profondes des voies génitales. La femelle s'est comportée *comme étant non fertilisée*.

IV. — L'AMIXIE ENTRE LES DEUX TYPES. — SES CARACTÈRES. — INTERCROISEMENT INTER-RACIAL OU INTERCROISEMENT INTERSPÉCIFIQUE ?

Les expériences que nous venons de relater mettent en évidence l'existence certaine d'une barrière amixique entre les deux types de glossines étudiés, pourtant si voisins l'un de l'autre. Les essais d'intercroisement effectués montrent que les mélanges génétiques sont plus ou moins radicalement inhibés dans leur portée et leur

efficacité réelle par différentes influences contrariantes qui n'opèrent pas de manière rigoureusement uniforme dans tous les cas, mais qui, finalement, aboutissent à rendre impossible le mélange durable des deux formes.

1° INCOMPATIBILITÉS D'ORDRE MORPHOLOGIQUE. — Les expériences exposées plus haut de F. L. Vanderplank l'ont amené à considérer que la conformation inadaptée des crochets inférieurs (paramères) ou supérieurs (cerques) des mâles hétérologues dans les accouplements croisés des sous-espèces de *palpalis* aboutit, dans beaucoup de cas, à la mort des femelles intercroisées. Les mâles *palpalis palpalis* ne pourraient d'ordinaire s'accoupler avec les ♀ *fuscipes* sans déterminer chez celles-ci des lésions mortelles, si l'on n'a pas pris soin de sectionner au préalable l'extrémité des cerques. Dans l'autre sens du croisement : *fuscipes* × *palpalis palpalis*, sur 29 couples expérimentés par cet auteur, 6 pupes seulement furent obtenues.

Dans mes expériences personnelles, les effets de l'incompatibilité morphologique ont été certainement moins marqués. La mortalité apparemment consécutive à l'accouplement chez les femelles expérimentées s'est en effet montrée la suivante :

Croisements ♂ *palpalis palpalis* × ♀ *fuscipes* q. : 2 ♀ mortes sur 6 expérimentées.

Croisements ♂ *palpalis palpalis* × ♀ *fuscipes* q. : 2 ♀ mortes sur 8 expérimentées.

Croisement ♂ *fuscipes* q. × ♀ hybride : 0 mort sur 1 ♀ expérimentée.

Croisement ♂ *fuscipes* q. × ♀ hybride : 0 mort sur 1 expérimentée.

Croisement ♂ hybride × ♀ hybride : 3 ♀ mortes sur 4 expérimentées.

Au total, dans les différentes expériences, sur 29 femelles mises en épreuve, 8 sont mortes prématurément, vraisemblablement des suites du croisement, 21 ont résisté, soit 72,4 p. 100.

2° BARRIÈRE PSYCHIQUE. — Nous avons vu qu'il n'en existait pas entre *palpalis palpalis* et *fuscipes quanzensis*. Les mâles sont attirés par les femelles dans les deux sens du croisement, aussi bien et parfois mieux que dans les contacts homospécifiques.

3° BARRIÈRES D'AMIXIE PHYSIOLOGIQUE. — Celles-ci sont les plus importantes à considérer. Leurs effets se sont en effet traduits :

1° Par l'obtention difficile d'hybrides F¹. Sur un total de 14 ♀ soumises à des croisements interspécifiques, il n'y en a guère que deux qui ont réussi à produire des pupes. 10 pupes hybrides seulement ont été obtenues de cet ensemble d'expériences.

2° Par l'impossibilité d'obtenir une descendance F^2 , de ces hybrides.

A quelles causes peut-on rapporter la difficulté d'obtention de femelles fécondes à la suite de ces intercroisements, lorsque les femelles ont résisté aux effets de l'accouplement avec un mâle hétérologue. On peut répondre à cette question en affirmant que, dans la plupart des cas, il n'y a pas eu de fertilisation véritable, malgré, souvent, des accouplements réitérés. Ce défaut de fertilisation est rendu apparent par l'observation de l'état des ovaires chez les mouches qui, après accouplements, n'ont pas produit de descendance. Ces femelles, comme il a été indiqué, traduisent toujours le blocage des ovules mûrs dans les ovarioles; elles se comportent ainsi exactement comme les femelles vierges, chez lesquelles les ovules, même en état de maturité, ne descendent jamais dans l'utérus (Roubaud, 1909). Il y a parfois, à la suite de l'encombrement des ovaires par les ovules les plus âgés, rupture des parois des ovarioles et libération des ovules mûrs dans la cavité générale où ils sont peu à peu résorbés et réduits à leur chorion flétri; mais je n'ai jamais constaté, au moins dans le groupe de *palpalis*, de descente d'œuf non fécondé dans l'utérus, ni de développement parthénogénétique ovulaire.

Destruction rapide des spermatozoïdes dans les voies génitales des femelles intercroisées. — L'absence de fertilisation de la plupart des femelles intercroisées avec des mâles hétérologues, dans nos expériences, tient-elle à une absence d'insémination par suite de l'insuffisance des mâles, à un défaut d'adaptation de leur hypopyge aux voies génitales des femelles, ou bien faut-il y voir la conséquence d'incompatibilités physiologiques plus profondes? L'examen des spermathèques et de leurs canaux chez les femelles qui ont subi les intercroisements, permet de répondre, d'une manière formelle, à cet égard. La stérilité est liée à une incompatibilité physiologique qui détermine la destruction précoce des spermatozoïdes déposés dans les voies génitales des femelles. C'est là le phénomène essentiel de l'amixie. Nous avons noté constamment chez les femelles demeurées stériles, malgré des accouplement répétés, que les éléments mâles vivants ne sont plus perceptibles dans les spermathèques. Celles-ci et leurs canaux sont remplis par une matière granuleuse qui traduit la lyse et la décomposition sur place de la matière séminale.

Dans un cas seulement (♀ de l'expérience *b*) quelques spermatozoïdes vivants furent décelés au point de contact d'un des canaux des spermathèques dans l'utérus, mais aucun élément fertilisateur n'a été visible dans d'autres régions plus profondes de l'appareil femelle, notamment dans les spermathèques elles-mêmes.

S'il existe réellement une amixie physiologique liée à la non-

conservation des éléments mâles hétérologues dans les voies génitales des femelles, phénomène qui nous paraît donner la raison profonde de la stérilité habituelle des accouplements croisés, on peut se demander pour quelle raison cependant certaines femelles échappent à cette barrière fondamentale d'amixie et parviennent à produire des descendants hybrides. Pourquoi, en d'autres termes, la destruction des spermatozoïdes s'opère-t-elle chez les unes et non chez les autres ?

On pourrait supposer que le phénomène est lié, avant tout, à des conditions de vie plus ou moins défavorables, dues à la captivité. Afin de répondre à cette objection, j'ai étudié comparativement la durée de conservation des spermatozoïdes chez des femelles qui s'étaient accouplées normalement avec des mâles de même type et chez des femelles intercroisées ayant manifesté une fécondité et qui furent ensuite privées de mâles.

On sait que chez les femelles de tsés-tsés qui ont subi des accouplements normaux homologues, les éléments mâles se maintiennent vivants dans les spermathèques pendant toute la vie des mouches. C'est ce qu'ont bien confirmé les constatations ci-après.

Chez une femelle *palpalis palpalis* accouplée le 6 mars avec un ♂ de même origine *palpalis palpalis* de Yaoundé, des spermatozoïdes abondants et actifs étaient présents dans les conduits des spermathèques, au moins vingt jours plus tard. Un autre examen a été fait chez une ♀ *fuscipes quanzensis* dans les conditions suivantes : la femelle qui s'était accouplée avec un ♂ de même souche, le 22 janvier, a été séparée du mâle le 14 février. Demeurée seule à partir de cette date, elle n'a pondu que beaucoup plus tard, le 29 mars, sa première larve de souche pure ; elle en a donné une deuxième le 8 avril. Examinée à sa mort, le 29 avril 1952, cette glossine présentait encore de nombreux spermatozoïdes actifs *plus de deux mois et demi après la séparation d'avec le mâle qui l'avait fécondée*. On voit donc, que malgré les conditions de la captivité à Paris, cette *fuscipes* de Brazzaville a conservé ses spermatozoïdes homologues pendant un temps prolongé, ainsi qu'il est de règle dans les conditions normales (3).

Par ailleurs, j'ai étudié comparativement une femelle *fuscipes* fertile de la première expérience d'intercroisement avec ♂ *palpalis palpalis* (9 novembre 1951). Cette femelle, demeurée sans mâle depuis le 2 février 1952, a produit sa dernière ponte hybride le 18 février. Morte près d'un mois plus tard, le 15 mars, sans avoir

(3) Le maintien prolongé des éléments mâles dans les voies génitales des femelles garantit à celles-ci la conservation de la reproduction, généralement jusqu'à la fin de la vie, sans le secours des mâles. Le phénomène est en rapport avec la disparition de l'attraction des femelles âgées pour les mâles.

donné de nouveaux descendants hybrides, aucun spermatozoïde vivant n'a été décelé dans les spermathèques, mais seulement l'amas granuleux habituel témoignant de la destruction totale des éléments mâles hétérologues. La condition de l'ovaire présentant un ovule mûr bloqué dans l'ovariole, selon le type de la figure 1, démontre que la femelle avait épuisé, après sa dernière gestation datant du début de février, les éléments séminaux déposés par le ♂ *palpalis palpalis* et qu'elle s'est alors comportée, jusqu'à sa mort, comme une femelle non fécondée. Cette expérience permet donc de reconnaître que même dans le cas où les femelles de *fuscipes* livrées à un accouplement interspécifique avec ♂ *palpalis palpalis* ont pu être fertilisées au début et donner des pontes, l'amixie opère et les éléments ♂ hétérologues en excès n'en sont pas moins détruits plus ou moins rapidement dans les voies génitales, rendant impossibles, par la suite, de nouvelles parturitions.

Les mêmes constatations ont été faites pour la ♀ *palpalis palpalis* de l'expérience *a* ci-dessus qui, accouplée avec ♂ *fuscipes* les 7-8 janvier et isolée du mâle ensuite, a donné 4 pupes hybrides du 25 janvier au 25 février. Morte le 10 mars sans nouvelle ponte, son tractus génital s'est montré vierge de spermatozoïdes.

On est fondé à penser que les femelles qui parviennent à la ponte dans les hybridations du type qui nous occupe, ne doivent leur fécondité passagère qu'à des accouplements répétés, permettant un renouvellement incessant de la masse spermatique déversée par les mâles hétérologues dans leurs voies génitales.

On pourrait se demander si la stérilisation spermatique des femelles dans nos expériences d'intercroisement ne serait pas due simplement à des conditions physiologiques défavorables du fait de la captivité. Nous avons en effet, avec J. Colas-Belcour (1936), signalé la stérilité d'une souche de *Gl palpalis* importées de l'Ouganda (4) et dont les femelles, malgré des accouplements réitérés avec des ♂♂ homozygotes, ne donnèrent aucune descendance. A l'examen microscopique elles ne montrèrent pas de spermatozoïdes dans leurs voies génitales, mais, par ailleurs, plusieurs d'entre elles présentèrent un ovule mûr descendu dans l'utérus, signe de gestation commençante et, par suite, d'insémination. Toutefois les spermatozoïdes disparurent ; le développement de l'œuf ne put s'effectuer. La cause de cette disparition des réserves spermatiques et de la stérilité qui en est résultée apparaît bien, ici, due aux circonstances défavorables qui avaient accompagné le transport des glossines en plein hiver et qui se traduisirent par une mortalité considérable, d'un type particulier, que j'ai relatée à l'époque. Chez les rares femelles qui purent survivre, le choc physiologique ne s'en

(4) Ces glossines furent reconnues par la suite comme appartenant au type *fuscipes* vrai.

est pas moins traduit par des perturbations importantes, révélées par la stérilité, malgré des accouplements homozygotes.

Dans nos expériences actuelles d'intercroisement, comme le montrent les observations relatées plus haut, les souches *palpalis palpalis* et *fuscipes* pures de nos élevages se sont toujours montrées fertiles et il n'a pas été constaté d'anomalies reproductrices imputables aux conditions anormales de captivité. La première souche, en particulier, originaire de Yaoundé, a été entretenue pendant plus d'une année en état de reproduction continue satisfaisante.

Ces faits me paraissent permettre d'affirmer que si, dans la plupart des cas, les intercroisements entre les deux formes de glossines étudiées demeurent stériles, la raison principale en doit être cherchée dans l'incompatibilité physiologique naturelle des conjoints, beaucoup plus que dans les influences stérilisantes dues à la captivité, ou dans les incompatibilités sexuelles d'ordre morphologique. Je m'écarte ici quelque peu de la manière de voir de F. L. Vanderplank (1948) pour lequel la disharmonie morphologique des *genitalia* constitue la principale barrière qui s'oppose à des accouplements fructueux dans les croisements interspécifiques ou intergroupes chez les Glossines.

Pour moi, c'est l'incompatibilité *physiologique* des conjoints croisés, qui dans les intercroisements *fuscipes* et *palpalis palpalis*, s'oppose à une réussite durable de l'hybridation, par suite de la destruction rapide des spermatozoïdes déposés par les mâles chez les femelles hétérologues. Ce phénomène a été également observé dans le cas des femelles hybrides F¹ accouplées avec ♂♂ *palpalis* ou *fuscipes* purs (expérience des Préférences ou première expérience). Il permet d'expliquer l'impossibilité où je me suis trouvé, d'obtenir des hybrides de première génération dans les essais en question.

La position systématique relative de fuscipes et de palpalis palpalis à la lumière des expériences d'intercroisement. — Les expériences relatées d'intercroisement entre *fuscipes quanzensis* et *palpalis palpalis* amènent à la conclusion qu'il existe entre ces deux types de glossines du groupe *palpalis*, si faiblement différenciées par leurs caractères morphologiques, des différences biologiques vraiment profondes. Les distinctions minimes d'ordre morphologique qui les caractérisent se trouvent ainsi fortement appuyées par les incompatibilités physiologiques révélées par la résistance au croisement. Les barrières existant entre ces deux formes sont aussi importantes que celles qui sont habituellement relevées entre les *espèces vraies*, reconnues par la Systématique. Elles m'apparaissent par suite comme ayant une signification davantage spécifique que raciale ou subspécifique. La question doit donc se poser de savoir s'il faut continuer à les maintenir

dans cette dernière acception. Avant d'y répondre, il sera nécessaire de multiplier des expériences comparatives d'intercroisement entre les différentes sous-espèces distinguées par la nomenclature, dans le groupe *palpalis*, en particulier *martinii*, *fuscipes* type et *fuscipes quanzensis* (5).

V. — L'HYBRIDATION EN TANT QUE FACTEUR NATUREL DE RÉDUCTION DES POPULATIONS DE TSÉ-TSÉS. LA MÉTHODE DES INTERCROISEMENTS RÉGULATEURS.

La production d'hybrides stériles dans les intercroisements de tsé-tsés a permis d'envisager les mélanges d'hybridation entre les types de glossines comme un moyen naturel de les combattre. C'est l'idée notamment, qui a guidé W. H. Potts (1944) lorsqu'il a expérimenté le croisement des deux espèces de l'Est africain *Gl. morsitans* et *Gl. swynnertoni*. L'auteur estime que la faible production d'hybrides obtenus au cours de ces intercroisements (5 sur 28 essais dans un sens, 5 sur 40 dans l'autre) peut constituer un moyen de contrôle d'une espèce locale donnée, si sa densité est faible. Corson, de son côté, n'a obtenu que 3 pupes de 12 ♀ de *morsitans* intercroisées avec ♂♂♂ *swynnertoni*. Il est donc permis d'espérer que l'introduction dans ses gîtes d'une autre espèce voisine permettra de stériliser et de stopper l'espèce régnante. F. L. Vanderplank (1944, 1947 a), Jackson, etc., ont développé également ces conceptions et les ont soumises au contrôle de l'expérience.

Du point de vue théorique, les phénomènes d'amixie physiologique relevés dans notre présente étude entre *palpalis palpalis* et *fuscipes quanzensis* sont pleinement favorables à cette thèse : ils lui apportent, d'autre part, un fondement objectif d'une nature plus positive que celle qui a été jusqu'ici envisagée dans les travaux anglais.

L'amixie porte, selon nous, sur les phénomènes de spermatolyse ou de non-conservation dans les voies génitales des femelles hétérologues, de la masse spermatique déposée par les mâles de souche différente. Or, puisqu'il ne semble pas exister de barrière d'ordre psychique ou sensoriel s'opposant à l'attirance sexuelle des mâles pour les femelles d'une autre souche, les intercroisements doivent apparaître *ipso-facto* comme un moyen certain de réduction spontanée des peuplements hétérologues en contact, par suite de la

(5) La question qui se pose ici est la même qui se rencontre toutes les fois que l'on tente d'éprouver, par la voie des intercroisements, la validité naturelle des variétés ou sous-espèces distinguées morphologiquement par de minimes caractères, chez les insectes piqueurs. Les phénomènes d'amixie physiologique constatés rehaussent souvent au rang de différences spécifiques la valeur de ces caractères.

destruction d'une grande partie des ressources spermatiques des mâles, s'il survient des accouplements non spécifiques. On est en droit d'espérer que ces mélanges amixiques agiront au titre de facteurs stérilisants, au moins partiels, de manière à restreindre considérablement la capacité reproductrice de la faune mixte de glossines en cause.

Nous sommes ainsi amené à une conception un peu différente de celle des auteurs qui nous ont précédé, dans l'appréciation des conséquences possibles des intercroisements des tsé-tsés: jusqu'ici ont été envisagés comme moyens réductionnels issus de ces mélanges, soit l'action nocive exercée par les mâles hétérologues sur les femelles croisées (Vanderplank), soit le faible nombre et la faible fécondité des hybrides produits.

Nous avons déjà dit ce qu'il convenait de penser de l'action nocive des mâles dans le type d'intercroisement régulateur qui nous occupe. Elle ne semble pas avoir une portée d'efficacité bien générale. Quant aux raisons de la faible fécondité des femelles hybrides, F. L. Vanderplank les a longuement discutées sans avoir, semble-t-il, aperçu le phénomène de la destruction des spermatozoïdes hétérologues, qui nous apparaît fondamental. L'auteur a donné (1948) des tableaux de la proportion des femelles inséminées à la suite des accouplements de types divers, spécifiques, interspécifiques ou intergroupes. Ces tableaux font valoir une proportion toujours élevée de mouches reconnues comme présentant des spermatozoïdes dans les spermathèques. Mais ces observations ne font état que de la durée relative des accouplements susceptibles de permettre l'insémination des femelles, non de la durée de conservation des spermatozoïdes dans les voies génitales. Il est bien évident que si l'on examine les spermathèques peu de temps après l'intervention d'un accouplement d'une certaine durée, les spermatozoïdes seront présents. Il n'en sera pas de même quelques jours plus tard.

Ainsi, la faible productivité des femelles croisées, de même que la faible productivité des hybrides sont pour nous la conséquence d'un seul phénomène fondamental, la non-conservation prolongée dans leur organisme des éléments mâles hétérologues.

Appliquée à la lutte contre les glossines, la méthode biologique des « Intercroisements régulateurs » (Roubaud, 1945), se traduira donc, en fait, par une réduction à l'extrême des possibilités de multiplication des espèces ou des sous-espèces en contact, par suite de l'épuisement rapide du réservoir spermatique des mâles. C'est là un mécanisme différent de l'intervention réductrice espérée lors des intercroisements régulateurs chez les Culicides, à la suite desquels on observe souvent, par des modalités diverses, une diminution des populations de moustiques. C'est ainsi que, lors des hybridations spontanées des *Culex* auto-

gènes (Roubaud, 1945), peut survenir un stoppage important des populations culicidiennes résultant des influences létales exercées sur les larves hybrides. Un grand nombre d'entre elles se montrent inaptes à l'éclosion et beaucoup de pontes hybrides, quoique fécondées, demeurent stériles. Dans les intercroisements des sous-espèces de l'*Anopheles maculipennis*, en particulier des biotypes *typicus* et *atroparvus*, l'inaptitude des imagos et des larves hybrides à poursuivre une évolution normale, régulière, a été également mise en évidence par Swellengrebel et ses collaborateurs comme par moi-même.

Quelle que soit sa diversité de nature, le mécanisme régulateur n'en est pas moins apparent dans toutes ces manifestations d'hybridations inter-raciales ou interspécifiques de Diptères pathogènes. Il est désormais permis d'envisager que la réalisation opportune de tels *intercroisements réducteurs* doit devenir, entre les mains de biologistes et d'entomologistes avisés, un moyen biologique nouveau d'action, non seulement contre les Glossines, mais contre bien d'autres indésirables pullulations d'Arthropodes nuisibles. Un champ considérable d'investigations ouvre ici ses perspectives.

BIBLIOGRAPHIE

- C. H. N. JACKSON. *Proc. R. ent. Soc. Lond.*, série A, 1945, **20**, 106 ; *Bull. ent. Res.*, 1946, **37**, 291.
- E. KLEINE. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1909, **35**, 1956 (Abstracted in *Bull. Sleep. Sickn. Bur.*, 1909, **1**, 449).
- L. MAILLOT. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46**, 1066.
- Helen MELLANBY. *Parasitology*, 1937, **29**, 131.
- R. NEWSTEAD. *Bull. ent. Res.*, 1910, **2**, 107.
- W. S. PATTON. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 1936, **80**, 305.
- W. H. POTTS. *Bull. ent. Res.*, 1937, **28**, 129 ; *Tsetse Res. Rep. Tanganyika 1935-1938*, 1940, 53 ; *Nature*, 1944, **154**, 606.
- E. ROUBAUD. Thèse, Faculté des Sciences, Paris, 1909.
- E. ROUBAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **220**, 229. ; *Bull. Soc. Path. exot.*, 1952, **45**, 389.
- E. ROUBAUD et J. COLAS-BELCOUR. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1936, **29**, 691.
- F. L. VANDERPLANK. *Nature*, 1944, **154**, 607 ; *Proc. R. ent. Soc. Lond.*, série A, 1945, **20**, 105 ; a) *Trans. R. ent. Soc. Lond.*, 1947, **98**, 1 ; b) Thesis submitted for Ph. D. at Bristol University, 1947 ; *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1948, **42**, 131 ; *Proc. R. ent. Soc. Lond.*, 1949, **18**, 69.
- F. ZUMPT. *Arch. Schiffs-u-Trop-Hyg.*, 1935, **39**, 141.

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DE LA TOXINE CHOLÉRIQUE :
VARIATION DU POUVOIR TOXIQUE
DE *VIBRIO CHOLERÆ* (OGAWA)
AU COURS DE LA MALADIE

par J. GALLUT (*).

(Institut Pasteur.)

L'étude de la toxine cholérique, qui a suscité depuis la découverte de *Vibrio cholerae* (R. Koch, 1883) de très nombreux travaux, a toujours fait ressortir, quelles que soient les techniques proposées, la faible activité relative de ce poison microbien élaboré *in vitro*.

Nous étant nous-même attaché longuement à cette question avec notre maître P. Noël Bernard [2], nous avons pu réduire le temps de production de la toxine cholérique à une durée minima (quatre heures), comparable au temps d'apparition des phénomènes toxiques dans les cas de choléra aigus, sans toutefois parvenir à augmenter régulièrement son activité. La dose minima mortelle pour la souris blanche de 15 g était en moyenne de 0,05 cm³ par voie intrapéritonéale, soit environ 0,05 mg d'endotoxine, dans les cas les plus favorables, valeurs comparables à celles qu'ont obtenues dans les meilleures conditions d'autres auteurs avec des techniques différentes (notamment Burrows [3]).

Toutefois, le contraste entre le faible pouvoir toxique des vibrions isolés jusqu'à présent et le caractère éminemment toxique des symptômes du choléra, pouvait laisser supposer l'existence de *V. cholerae* particulièrement toxigènes, jamais encore isolés, mais susceptibles d'être mis en évidence par des recherches systématiques de la toxicité pratiquées sur un très grand nombre de souches. A notre connaissance, il ne paraît pas que ces espoirs aient été jamais justifiés de découvrir un spécimen de vibron cholérique dont la toxicité se révélât *in vitro* comparable à celle décelée chez d'autres espèces bactériennes (par exemple la souche Park et William n° 8 du bacille diphtérique).

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 février 1954.

Grâce à l'extrême obligeance qu'a bien voulu nous témoigner à maintes reprises déjà, notre excellent collègue et ami le Dr William Burrows de Chicago, nous avons pu bénéficier d'un matériel exceptionnel pour poursuivre nos recherches dans cette voie. Le Dr Burrows a en effet effectué récemment dans l'Inde un voyage d'études qui lui a permis, avec le Dr C. E. Lankford de l'Université du Texas, d'isoler un grand nombre de souches de *V. cholerae*, et ce dans des conditions particulièrement favorables pour une telle recherche. Ils ont pu suivre une série de cas de choléra au *Nilratan Sarkar Medical College Hospital (Campbell Hospital)* de Calcutta en février 1953, et ils ont procédé à l'isolement quotidien de *V. cholerae* dans chacun d'eux. Un grand nombre de ces souches ont été mises à notre disposition dans les plus brefs délais.

Nous sommes heureux d'adresser ici nos plus vifs remerciements à W. Burrows et à C. E. Lankford.

EXPÉRIMENTATION (1).

1° SOUCHES. — Nous avons utilisé 40 vibrions cholériques provenant de 10 cas de choléra, soit une moyenne de 4 souches pour chaque cas. Ces vibrions étaient tous du type *Ogawa* et de forme S, à l'exception d'un seul (n° 64) de forme R. Ils ont été lyophilisés dès leur réception et n'ont subi en général avant nos expériences qu'un seul passage sur milieu artificiel.

Les renseignements cliniques qui nous ont été fournis signalent un seul décès (cas n° 140) sur ces 10 cas. Cependant les symptômes ont toujours été sévères et typiques. L'observation suivante d'un malade à son entrée à l'hôpital est généralement applicable à tous les autres cas :

Cas n° 250 : femme C... B... D... Entrée le 27 février à 7 heures, début dix-sept heures auparavant. Selles : 9 à 10, riziformes. Urines : supprimées. Vomissements : abondants et répétés. Déshydratation : très marquée. Langue : sèche et saburrale. Pouls : imperceptible. Respiration : 24. Température : rectale, 37°2 ; axillaire, 36°1. Tension artérielle : non mesurable. Densité du sang : 1 066. Crampes +.

D'une manière générale il faut noter qu'aucun des malades (sauf le cas n° 20 qui avait absorbé une quantité indéterminée de sulfaguanidine) n'avait reçu de traitement avant l'admission et que tous ont été traités uniquement par des perfusions intraveineuses d'eau salée glucosée. Ajoutons enfin qu'aucun des malades n'avait subi la vaccination anticholérique.

(1) Les résultats succincts de ce travail ont fait l'objet d'une note à l'Académie des Sciences [5].

2° PRÉPARATION DE LA TOXINE. — Nous avons adopté la technique de préparation en quatre heures (P.-N. Bernard et J. Gallut [4], qui, outre l'avantage de la rapidité, offre celui d'une grande régularité dans les résultats.

Chaque souche est cultivée en boîtes de Roux sur gélose peptonée (gélose 30, peptone UCLAF 30, Na Cl 5 p. 1 000, pH 8,0), les vibrions récoltés après seize heures à 37°, sont lavés dans l'eau salée (Na Cl 8,5 p. 1 000), centrifugés et remis en suspension dans 5 cm³ par boîte d'eau salée glucosée (Na Cl 8,5, glucose 5 p. 1 000). Une portion aliquote de cette suspension, convenablement diluée (1/200) permet d'évaluer au photomètre électrique sa teneur en germes, et, par addition de la quantité ainsi déterminée d'eau salée glucosée, de la ramener au taux uniforme de 800 milliards de vibrions par centimètre cube. Il convient de noter du reste, que les quantités récoltées par boîte de Roux sont dans l'ensemble très sensiblement les mêmes d'une souche à l'autre, et que les corrections étant généralement minimales, chaque boîte fournit environ 5 000 milliards de vibrions, soit une suspension d'un volume de 6,25 cm³ (\pm 10 p. 100) pour la teneur adoptée de 800 milliards de germes par centimètre cube.

Après un séjour de quatre heures à 37°, tout le glucose est consommé et le pH abaissé à 5,8. La toxine est mise en liberté par la mort des vibrions qui s'autolysent sous l'influence de l'acidification qu'ils déterminent par la fermentation du glucose. La suspension est centrifugée pendant vingt-cinq minutes à 5 000 t/m et le liquide surnageant, qui contient pratiquement toute la toxine des vibrions utilisés, est agité pendant quelques minutes avec du toluène pour stériliser éventuellement les rares germes vivants qui pourraient rester en suspension.

3° MESURE DE LA TOXICITÉ. — Tous nos essais ont été faits sur la souris blanche de 15 g. Pour chaque souche nous avons inoculé un minimum de 24 souris réparties en 4 groupes de 6 recevant respectivement 0,2, 0,1, 0,05 et 0,025 cm³ de toxine par voie intrapéritonéale, soit l'équivalent toxique de 160, 80, 40 et 20 milliards de germes. Les résultats ont été notés jusqu'à la soixante-douzième heure, la mort des souris survenant le plus généralement dans les vingt-quatre premières heures. Autant qu'il a été possible de le faire, vu le nombre important des animaux utilisés (1 550), certaines expériences ont été répétées, ce qui nous a permis de vérifier la constance des résultats fournis par les mêmes souches (\pm 10 p. 100).

La méthode de Reed et Muench [8] a été adoptée pour le calcul de la dose mortelle 50 p. 100 (DM 50). Le titre de la toxine est indiqué par le nombre de DM 50 par centimètre cube.

TABLEAU I. — Résultats des dosages de la toxicité.

Choléra cas n°	Souche n°	Heure de l' isolement	DM 50 (cm)	Titre de la toxine	Coefficient d'hyper- toxicité
20	21	11	0,055	18,1	5,0
	22	35	0,1	10,0	
	23	59	0,02	50,0	
	24	83	0,089	11,2	
60	61	31	0,05	20,0	7,4
	62	55	0,062	16,0	
	64	103	0,37	2,7	
110	111	4	0,151	6,6	5,4
	112	28	0,142	7,0	
	113	52	0,057	17,5	
	114	76	0,295	3,5	
	115	100	0,305	3,2	
130	131	30	0,071	14,0	2,1
	132	54	0,041	24,5	
	133	78	0,089	11,2	
	134	102	0,066	15,1	
140	141	32	0,058	17,2	1,5
	142	56	0,042	23,8	
	143	80	0,039	25,6	
	144	104	0,054	18,5	
170	171	16	0,066	15,1	2,7
	172	40	0,087	11,4	
	173	64	0,056	17,8	
	174	88	0,032	31,2	
	175	112	0,072	13,8	
280	281	6	0,09	11,1	2,4
	282	30	0,05	20,0	
	283	54	0,091	10,8	
	284	78	0,121	8,2	
320	321	6	0,05	20,0	5,6
	322	30	0,027	37,0	
	325	102	0,152	6,5	
350	352	52	0,05	20,0	3,8
	353	76	0,03	32,3	
	354	100	0,04	25,0	
	355	124	0,11	8,4	
410	411	6	0,2	5,0	3,5
	412	30	0,07	14,2	
	414	78	0,25	4,0	
	416	126	0,2	5,0	

4° RÉSULTATS. — Ils sont indiqués dans le tableau I où figurent également l'heure d'isolement comptée à partir du début de la maladie et le titre de la toxine fournie par chaque souche. Le titre est indiqué aussi dans la figure 1 avec le jour de l'isolement : ce graphique fait ressortir nettement que la toxicité des diverses souches n'est pas constante. Elle varie non seulement d'un cas de choléra à un autre, mais aussi dans chaque cas pris isolément. C'est à notre avis le point essentiel de ce travail de montrer qu'un vibron de toxicité maxima a été isolé chez les 10 cholériques

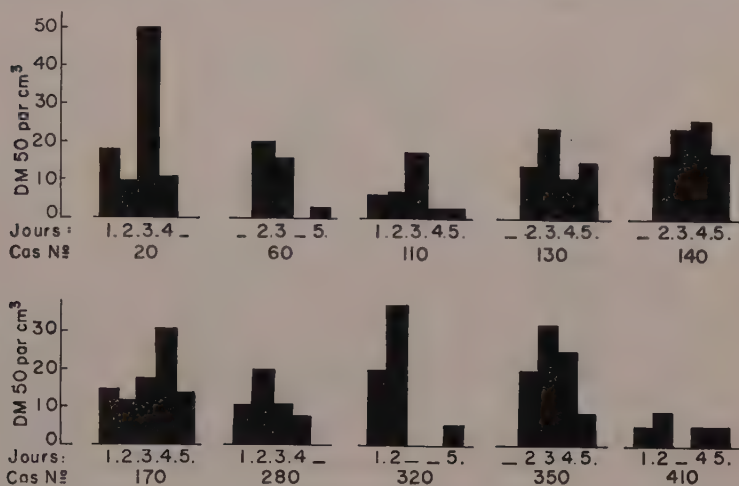


FIG. 1. — Titre de la toxine fournie par chaque souche de *V. cholerae* Ogawa : sous chaque rectangle représentant le titre de la toxine, est indiqué le jour de l'isolement chez le malade dont le numéro figuré à la ligne suivante, correspond à chaque groupe des souches de même origine.

sans exception. Ce « vibron hypertoxique » fournissant une toxine de 1,5 à 7,4 fois plus élevée que celle du vibron le moins toxique de la même origine, a en général été isolé au milieu de la maladie, soit au cours du deuxième ou du troisième jour.

Devant cette concordance des résultats, et la durée d'évolution de chaque cas ayant été sensiblement la même, nous avons calculé l'horaire de la toxicité moyenne. Cette moyenne, reportée en courbe dans la figure 2, fait ressortir le maximum de toxicité du vibron cholérique entre cinquante-deux et soixante-deux heures, plus précisément vers la soixantième heure.

Les résultats fournis par les vibrions isolés du seul cas mortel (n° 140) ne sont pas en contradiction avec les autres : le « vibron hypertoxique » y a été isolé à la quatre-vingtième heure, toutefois la toxicité étant du même ordre (— 7 p. 100) à la cinquante-

sixième heure, la période d'hypertoxicité apparaît ici plus longue. Cette hypertoxicité prolongée est-elle en rapport avec l'issue fatale ? Il est permis de le penser, bien qu'il soit hasardeux de l'affirmer sur l'étude d'un seul cas.

Les vibrions les moins toxiques ont été isolés vers le cinquième jour : leur toxicité, parfois égale à celle des vibrions isolés au début de la maladie, n'atteint le plus souvent que la moitié de cette valeur. Le seul vibron de forme R isolé à la cent deuxième heure s'est montré de beaucoup le moins toxique, ce qui confirme l'amointrissement de la forme rugueuse de *V. cholerae*, aussi

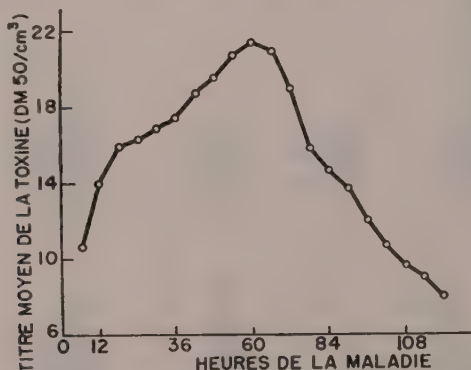


FIG. 2. — Variation de la toxicité de *V. cholerae* Ogawa en fonction de l'horaire de son isolement au cours de la maladie (moyenne de 10 cas de choléra).

bien en endotoxine qu'en antigène O, et souligne l'identité de ces deux éléments.

DISCUSSION.

L'interprétation des résultats que nous venons de rapporter nous amène à discuter un certain nombre de points que nous envisagerons successivement :

1° VALEUR DES RÉSULTATS. — Notons tout d'abord que la concordance des résultats, qui paraît *a priori* satisfaisante, est confirmée par leur interprétation statistique. Le calcul montre en effet que la probabilité d'obtenir par le seul fait du hasard des chiffres analogues est inférieure à 0,005 p. 100 : c'est dire qu'il y a moins de 1 chance sur 200 de trouver fortuitement des résultats identiques. Nous estimons donc que l'on peut tirer de nos expériences des conclusions valables.

2° NATURE DE LA TOXINE. — Nous avons mis en évidence en 1943 avec P.-N. Bernard [2] puis avec P. Grabar [6], deux frac-

tions toxiques différentes dans la toxine cholérique : l'une entérotope, à grosse molécule ($d > 100 \text{ m}\mu$) complexe de nature glucidolipidoprotidique, l'autre neurotrope (hypothermisante), à petite molécule ($d < 5 \text{ m}\mu$) de nature probablement protidique. Le dosage ultérieur de ces fractions pourra nous apporter des précisions sur la nature de la toxine des différents vibrions, et nous permettre de répondre peut-être à la question de savoir si l'hypertoxicité est due à l'augmentation simultanée des deux fractions ou à la prépondérance d'une seule.

3° MÉCANISME DE PRODUCTION DE LA TOXINE. — La mise en évidence d'un « vibron hypertoxique » dans chacun des 10 cas étudiés marque l'exaltation transitoire du pouvoir toxique de *V. cholerae*. Cette exaltation pourrait être attribuée soit à la sélection d'éléments hypertoxiques préexistants, soit à l'induction par un facteur toxigène présent chez le malade pendant une période déterminée, disparaissant ensuite.

Dans la première hypothèse, l'influence d'une température optima sur l'augmentation de l'équipement toxique pourrait être envisagée. L'hypothermie habituelle à la période d'état peut laisser supposer qu'à 35° par exemple, l'endotoxine serait élaborée en plus grande quantité qu'à 37° ou à des températures supérieures. A. Jude et P. Nicolle ont signalé récemment [7] que *Salmonella typhi* libère son endotoxine O à la période d'état de la fièvre typhoïde. La production de l'antigène typhique O est favorisée par les températures inférieures à 37° (jusqu'à 18°); mais ce bacille étant protégé par une « cuirasse » d'antigène Vi (A. Boivin) dont la production n'est élaborée qu'aux températures comprises entre 37 et 40°, la libération de l'antigène O par lyse bactérienne ne peut avoir lieu qu'à la faveur d'une température élevée (40° et plus) qui inhibe temporairement la production de l'antigène Vi. Or, à la différence de *S. typhi*, *V. cholerae* ne contient pas d'antigène Vi et l'on sait la facilité avec laquelle ce vibron s'autolyse; la mise en liberté de la fraction hypothermisante pourrait précisément favoriser par une baisse de température l'augmentation de production de l'endotoxine O. Le dosage de l'antigène cholérique O à des températures inférieures à 37° sera susceptible de nous renseigner à cet égard.

Dans l'hypothèse d'un facteur toxigène présent chez le cholérique, il serait vraisemblable qu'un tel facteur soit particulier à l'homme. L'exaltation de la toxicité de *V. cholerae* chez l'animal n'ayant jamais, à notre connaissance, donné de résultats probants, ceci peut être dû au fait que les expérimentateurs se sont bornés jusqu'ici à faire des passages du vibron d'un animal à l'autre sans préoccupation d'horaire. Si, comme nous l'avons constaté, le vibron terminal est moins toxique que le vibron inoculé,

l'échec de cette technique semble fatal avec les prélèvements faits à la période d'agonie ou même *post mortem*. On pourrait par conséquent envisager des expériences analogues à celles-ci dans le choléra expérimental (obtenu par exemple suivant la technique de Burrows [4]), avec prélèvements des germes dans les fèces à la période d'état. Bien que le peu d'aptitude de l'animal à reproduire un véritable choléra rende cet espoir assez vain, nous pensons néanmoins que chez lui aussi le contrôle de la toxicité par des isollements successifs et répétés devrait être tenté.

4° STABILITÉ DES SOUCHES TOXIQUES. — Comme nous l'avons souligné, nos expériences ont été effectuées avec des vibrions très récemment isolés et n'ayant subi qu'un minimum de passages en milieux artificiels ; l'instabilité notoire des souches cholériques ne permet malheureusement pas de supposer fixé le caractère hypertoxique de certaines d'entre elles. Des expériences de contrôle faites ultérieurement pourront nous faire préciser ce point.

5° CONSÉQUENCES PRATIQUES. — Il est remarquable que les vibrions les moins toxiques aient été isolés au début et à la fin de la maladie, soit précisément aux stades où se font le plus souvent les isollements habituels : les premiers pour le diagnostic bactériologique, les seconds pour vérifier que le convalescent n'est plus porteur de germes.

Il nous semble donc pouvoir en tirer la conclusion pratique que l'on devrait désormais s'attacher à rechercher les souches les plus toxiques au contraire à la période d'état de la maladie, soit vers la soixantième heure dans cette forme de choléra dont est responsable le type *Ogawa*, et qui est généralement la moins sévère. Pour la forme épidémique due au type *Inaba*, dont l'évolution est le plus souvent très accélérée il y aurait lieu, pour mener à bien des recherches analogues, de procéder à des isollements répétés à des intervalles plus courts (toutes les six heures par exemple) pour pouvoir en tirer des conclusions du même ordre. L'apparition du « vibron hypertoxique » *Inaba* devrait, selon nous, être décelée avant la vingt-quatrième heure dans les cas suivis de guérison et sans doute plus tôt dans les cas mortels.

CONCLUSIONS.

Il ressort de nos expériences que, dans 10 cas de choléra où plusieurs souches de *V. cholerae* *Ogawa* ont été successivement isolées au cours de la maladie, un seul vibron s'est révélé à chaque fois nettement plus toxique parmi ceux de même origine.

De plus, l'horaire d'isolement de ces « vibrions hypertoxiques »

correspondant à la période d'état du choléra, est comparable d'un cas à un autre, de telle sorte que, chez ce groupe de malades, l'horaire moyen de la toxicité maxima se situe à la soixantième heure de la maladie.

Les vibrions relativement peu toxiques ont été isolés au début et à la fin du choléra ; les derniers isolés sont généralement les moins toxiques.

Sans préjuger des variations de la composition de la toxine cholérique suivant l'horaire de l'isolement, du mécanisme de sa production et de la stabilité des souches hypertoxiques (toutes questions qui nécessiteront des recherches ultérieures), les faits exposés ici soulignent l'intérêt de rechercher les vibrions les plus toxiques à une période de la maladie où il n'est généralement pas fait d'isolement, et la possibilité éventuelle d'exalter la toxicité de *V. cholerae* par passages en série dans le choléra expérimental en l'isolant dans des limites de temps bien déterminées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P.-N. BERNARD et J. GALLUT. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 10 et 11.
- [2] P.-N. BERNARD et J. GALLUT. *Ces Annales*, 1945, **71**, 65.
- [3] W. BURROWS. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1944, **57**, 306.
- [4] W. BURROWS, M. E. ELLIOTT et J. HAVENS. *J. inf. Dis.*, 1947, **81**, 261.
- [5] J. GALLUT. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **237**, 1038.
- [6] J. GALLUT et P. GRABAR. *Ces Annales*, 1945, **71**, 83 et 321.
- [7] A. JUDE et P. NICOLLE. *Bull. Acad. Méd.*, 1953, **137**, 169.
- [8] L. J. REED et H. MUENCH. *Amer. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.

**L'ACTION DE *BACILLUS CEREUS*
VAR. *ALESTI* TOUM. ET VAGO
SUR LES CHENILLES DE *GALLERIA MELONELLA* L.
ET *HYPONOMEUTA COGNATELLA* HB.**

par C. TOUMANOFF (*).

(Institut Pasteur.)

Dans quelques travaux antérieurs, en collaboration avec M. Vago [2, 6], nous avons relaté les résultats de recherches concernant l'effet pathogène sur les vers à soie de *Bacillus cereus* var. *alesti*, agent de la flacherie infectieuse de ces insectes qui provoque des dégâts dans la région des Cévennes [9].

Il était intéressant de reconnaître l'action de ce bacille sur les chenilles d'autres Lépidoptères phytophages et aussi sur celles ayant un autre régime alimentaire.

Parmi ces derniers, les chenilles de la fausse teigne des ruches *Galleria melonella* L., qui se nourrissent de la cire, constituent un matériel de choix pour ce genre d'expériences, grâce à la facilité de leur élevage.

Metalnikov a constaté que les larves de la fausse teigne *Galleria melonella* L. présentaient une grande résistance contre certains bacilles très pathogènes pour d'autres Lépidoptères [1].

Dans ces essais Metalnikov se servait surtout de suspensions de diverses cultures sur gélose ordinaire dans l'eau physiologique, l'eau distillée ou bien sur les milieux liquides (bouillon ordinaire, bouillon pomme de terre, etc.), ajoutées à la nourriture de l'insecte.

Il a noté que, tandis que les chenilles de la pyrale du maïs (*Pyrausta nubilalis* Hb.) étaient sensibles à l'effet *per os* de certains bacilles, il fut presque impossible d'infecter celles de *Galleria melonella* par les mêmes germes, et cela dans des conditions comparables.

Il interpréta cette résistance comme due à l'adaptation de ces chenilles à l'existence dans un milieu souillé de leurs propres excréments, leurs cadavres et aussi divers déchets qui se trouvent

(*) Société Française de Microbiologie. Séance du 7 janvier 1954.

dans la cire dont elles se nourrissent et qui contiennent une flore bactérienne riche et variée.

Nous avons repris les expériences de Metalnikov et ces essais seront relatés ultérieurement.

Dans cette note il ne sera question que des expériences effectuées avec *B. cereus* var. *alesti* sur les chenilles de *Galleria melonella* et *Hyponomeuta cognatella* Hb.

A. — ESSAIS AVEC *Galleria melonella* L.

a) INFECTION PAR CULTURES SUR GÉLOSE. — Nous avons essayé tout d'abord l'infection des chenilles par des cultures jeunes et âgées de *Bacillus cereus* var. *alesti* Toum. et Vago sur gélose ordinaire, qui furent prélevées de la surface du tube et étalées sur des fragments de cire. Deux tubes de cultures furent généralement utilisés pour les fragments de rayon de 2 cm et les insectes maintenus à 30° C.

Ces expériences n'ont donné que des résultats inconstants et nous les indiquerons au passage sans détails.

Les expériences faites sur 100 chenilles ont démontré que 20 p. 100 d'entre elles seulement mouraient après ingestion de cire enduite de cultures jeunes (vingt-quatre à quarante-huit heures) et dans un délai variant de neuf à vingt jours après le repas infectant ; la plupart mouraient au moment de la transformation en chrysalides.

Par contre, l'administration de vieilles cultures (huit à dix jours) a donné une mortalité moyenne de 48 p. 100 des chenilles et, dans ce cas seulement, 10 p. 100 de larves présentaient *post mortem* une pullulation des bacilles dans leur corps.

L'observation des chenilles infectées dans les conditions mentionnées, démontra aussi que celles-ci ingérant la cire recouverte de culture sur gélose de *B. cereus* var. *alesti* présentaient un ralentissement dans leur transformation en chrysalides puis en papillons.

Nous avons constaté avec M. Vago que les vers à soie meurent constamment, tout aussi bien à la suite de l'administration des cultures que des broyats de vers ayant succombé au *Bacillus cereus* var. *alesti* desséchés et réduits en poudre.

Nous avons effectué aussi quelques contaminations de *Galleria melonella* avec ces broyats. Les résultats de nos expériences sont relatés ci-dessous.

b) INFECTION AVEC DE LA POUDRE DU BROyat DES CADAVRES DE VERS A SOIE MORTS DE *B. cereus* var. *alesti*. — Ces expériences ont été faites de trois manières :

1° La contamination des chenilles par le mélange de poudre de

vers avec de la cire, à raison de 500 mg avec la même quantité de cire ;

2° L'infection par la même quantité de cire additionnée de 250 mg de poudre ;

3° Par 125 mg de poudre infectante ajoutée à 500 mg de cire.

Voici, à titre d'exemple, quelques expériences à ce sujet :

1° 50 chenilles de *Galleria* sont nourries avec le mélange de poudre de cadavres de vers à soie et de cire en quantités égales. Expérience faite à 30° C ; quarante huit heures après une chenille meurt, le troisième jour une autre ; ensuite 15, 9, 5 et 2 chenilles meurent respectivement les cinquième, septième, neuvième et dixième jours. Dans l'ensemble 92 p. 100 des chenilles meurent dans ce temps, les autres se transforment en chrysalides puis en papillons.

Dans quatre autres essais portant respectivement sur 5, 5, 8 et 38 chenilles, la mortalité fut plus rapide et 100 p. 100 des insectes moururent dans un délai d'une semaine.

2° 16 chenilles reçoivent 250 mg de poudre avec 500 mg de cire. La mortalité est respectivement de 1, 2, 6 et 2 chenilles, les quatrième, cinquième et quatorzième jours après le commencement de l'expérience.

Au total une mortalité de 68 p. 100 a été enregistrée dans cette expérience. Dans un autre essai du même genre, sur 7 chenilles, 6 moururent dans un délai de dix jours.

3° Dans deux essais portant sur 25 chenilles qui furent infectées par 125 mg de poudre infectante, ajoutée à 500 mg de cire, 5 chenilles moururent dans un délai compris entre trois et six jours, 10 autres le huitième et 4 le quatorzième jour. La mortalité globale fut dans ce cas de 76 p. 100.

Il résulte de ces essais que l'administration de *B. cereus* var. *alesti* sous forme de poudre de cadavres provoque la maladie et la mort de *Galleria melonella*, dans une proportion assez élevée, quoique lentement.

Les phénomènes morbides chez les *Galleria* intoxiquées par l'ingestion du germe, consistaient en leur affaiblissement progressif et la mort, surtout peu avant leur transformation en chrysalides.

Les chenilles normales s'immobilisant également avant leur métamorphose, il était donc difficile, dans la plupart des cas, de distinguer les insectes normaux des malades.

Aucune mortalité n'ayant été observée chez les témoins, on ne saurait considérer les résultats obtenus comme fortuits.

L'examen du sang d'insectes paraissant malades, mourants et aussitôt après leur mort, n'a pas permis d'y déceler les bacilles.

La pullulation du germe a toutefois été observée dans le corps des chenilles *post mortem* dans 90 p. 100 des cas. Elle commençait au bout de douze à vingt-quatre heures ou plus tard et s'accompagnait d'une forte sporulation.

Nous avons observé, cependant, dans le sang d'insectes morts ou mourants, de fortes agglomérations de leucocytes, vacuolisés, à protoplasme se colorant très intensément en bleu par le Giemsa.

L'aspect de ces leucocytes rappelait celui des vers à soie, observé par nous avec M. Vago dans le cas de la flacherie infectieuse de *Bombyx mori*.

Sur coupes dans le tube digestif nous n'avons observé la présence des bacilles chez les insectes malades qu'exceptionnellement ; nous les avons décelés cependant constamment, quoique en quantité limitée, sur les frottis et par isolement.

L'examen histologique de l'intestin a montré une dégénérescence relativement faible des tissus.

Les parties antérieure et postérieure du tube digestif conservaient leur aspect normal. Ce n'est que dans l'intestin moyen que nous avons relevé des modifications pathologiques.

Les cellules de l'épithélium de cette partie de l'intestin présentaient une très forte vacuolisation que nous n'avons jamais observée chez les chenilles normales. Les cryptes des cellules de remplacement perdaient d'autre part leur coalescence en prenant une forme allongée et parfois irrégulière.

Dans l'ensemble cependant, chez les *Galleria* intoxiquées et mourantes les modifications histopathologiques observées sur coupes ne sont que faibles et peu importantes et peuvent passer inaperçues.

Le corps des chenilles mortes durcissant rapidement, il n'a pas été possible d'étudier les coupes d'insectes *post mortem*.

L'inclusion et les coupes d'insectes mourants furent également difficiles en raison du durcissement du corps exsangue ratatiné.

B. — ESSAIS SUR *Hyponomeuta cognatella* HB.

Les essais avec cet insecte ont été effectués également, d'une part par l'usage de cultures et, d'autre part, par la poudre obtenue par le broyage des cadavres des vers à soie morts de flacherie infectieuse.

Nous relaterons tout d'abord les résultats obtenus par le premier procédé.

Voici, à titre d'exemple, deux expériences que nous avons réalisées :

1° 12 chenilles reçoivent le 27 avril 1953 des feuilles de fusain (*Eonymus europeus*) humectées d'une suspension de culture de *B. cereus* var. *alesti* (10 anses dans 10 cm³ d'eau). Les chenilles mangent très bien.

Le 29 avril, toutes les chenilles sont en bon état ; le 30 avril, 4 sont mortes, les autres se déplacent lentement. Chez les mortes et les malades on constate la présence dans le sang des bacilles.

Le 1^{er} mai, 4 meurent, 2 sont malades, chez toutes on observe une septicémie.

Deux insectes meurent le 2 mai et les 2 autres le 5 mai 1953, tous avec des bacilles dans le sang.

2^o la poudre de cadavres de vers à soie morts de flacherie infectieuse desséchés et broyés, est étalée sur des feuilles légèrement humectées, qui furent distribuées à 12 chenilles d'*Hyponomeuta* le 27 avril, à 17 heures.

Le 28 avril, à la même heure, 2 chenilles sont malades ; le lendemain une meurt avec présence de bacilles dans le sang et 3 sont fortement malades. Toutes contiennent des bacilles dans le sang et dans l'intestin.

Le 2 mai, 2 chenilles restent vivantes, elles se transforment en chrysalides et meurent à l'état de chrysalides avec quelques spores dans leur corps.

Ces expériences plusieurs fois répétées ont toujours donné des résultats semblables. C'est ainsi que sur 100 chenilles infectées de poudre, 98 moururent de septicémie.

Sur 100 autres qui reçurent les suspensions bactériennes, 99 moururent également avec des bacilles dans le sang, une seulement étant exempte de bacilles dans le sang au moment de la mort.

En étudiant les coupes, nous avons pu constater que les premiers symptômes de la maladie chez *Hyponomeuta* s'accompagnaient d'une pénétration des bacilles dans la cavité générale.

Les symptômes consistaient en une parésie suivie d'immobilisation progressive des chenilles, qui, au stade d'infection avancée, devenaient complètement immobiles.

Contrairement à ce qu'on observait chez les vers à soie, le corps des chenilles conservait sa turgescence et ne devenait pas flat et mou comme chez les vers à soie. La teinte des chenilles changeait du vert au vert gris et elles noircissaient seulement deux à trois jours après la mort ; la décomposition ne survenait donc qu'assez tardivement.

Dans la partie antérieure du tube digestif les bacilles, par endroits nombreux, ont été trouvés en contact avec l'intime cuticulaire qui borde les cellules épithéliales et les sépare de la lumière intestinale. Il en était de même dans l'intestin postérieur. L'intime constitue donc, tout au moins chez cet insecte et contre ce germe, une enveloppe protectrice infranchissable.

L'étude des coupes histologiques a permis de constater que la pénétration du bacille dans le sang s'effectuait par l'intestin moyen et que c'était dans cette partie du tube digestif que se produisait également la plus forte pullulation du bacille.

L'effet histopathologique sur l'intestin moyen consistait dans la plupart des cas en la destruction totale de la membrane péritrophique qui, chez le ver à soie (Toumanoff et Vago [5]), demeure

rait par endroits complètement intacte. Il se manifestait aussi par une forte destruction des cellules épithéliales, dont la bordure en brosse était toujours détruite ; le protoplasme dissous était quelquefois dissocié en une série de cordons séparés d'espaces clairs.

La lumière intestinale, notamment dans le tiers antérieur et postérieur de l'intestin moyen, était remplie de cellules détachées de l'épithélium entourées de masses de bacilles, dont certains en voie de sporulation, même chez les chenilles encore vivantes, mais fortement atteintes.

Les noyaux des cellules épithéliales de l'intestin moyen accusaient des signes de pycnose et parfois, mais rarement, on observait la caryolyse.

L'aspect des cellules épithéliales de l'intestin moyen en « gobelet » était par endroits normal.

Certaines de ces cellules étaient cependant modifiées et elles fusionnaient avec les cellules épithéliales cylindriques du type ordinaire. Nous n'avons observé que rarement et exceptionnellement les bacilles isolés dans les cavités des cellules en gobelet, qu'elles soient intactes ou modifiées.

Il est intéressant de noter que la pullulation des bacilles dans l'intestin moyen était localisée surtout dans la partie supérieure des cellules épithéliales cylindriques au niveau de la membrane basale qui sépare l'intestin de la cavité générale. Le fait que cette membrane n'était par endroits ni disloquée, ni modifiée malgré le contact avec les masses des bacilles, permet de penser qu'elle exerce un rôle protecteur contre l'invasion de la cavité générale par le germe. On peut supposer que malgré le passage partiel des bacilles dans le sang la véritable invasion du corps ne s'effectue que lorsque cette membrane est rompue.

A certains endroits de l'épithélium les cellules étaient très fortement détruites par les bacilles ; on y voyait la partie inférieure complètement disloquée, la supérieure étant également fortement atteinte et décollée de l'intime, offrant un espace pour la pullulation bacillaire qui, dans ce cas, était observée aussi dans le protoplasme. Les noyaux y étaient, comme ailleurs du reste, globuleux et compacts, montrant des signes de pycnose (pl. 1, fig. 3).

Nous n'avons pas observé chez l'*Hyponomeuta*, comme chez les vers à soie avec M. Vago, l'invasion et la dislocation de la couche des muscles circulaires de l'intestin moyen, qui sont du reste moins développés chez cet insecte que chez *Bombyx mori*.

Ce n'est qu'exceptionnellement que nous avons constaté la pénétration des bacilles dans les cellules des différents organes. Ils ont été observés rarement dans le corps gras et aussi les cellules hypodermiques chez les insectes mourants.

Dans divers autres tissus les modifications ont été moins importantes que dans l'intestin moyen.

Nous avons observé une faible dégénérescence des cellules du corps gras, surtout celles ne contenant pas de graisse, qui se coloraient très intensément en noir par l'hématoxyline et aussi celles des tubes de Malpighi. D'autre part, dans divers tissus : muscles, système nerveux, etc., ont été observés des noyaux anormaux, des restes nucléaires ou des altérations du protoplasme, mais il est difficile de considérer ces modifications comme dues à l'effet du bacille. Elles peuvent, en effet, se rencontrer aussi chez les chenilles normales.

La réaction de défense de l'organisme contre l'invasion était assez manifeste, mais incomplète.

Les leucocytes formaient des amas autour du tube digestif infecté. Ils constituaient parfois un véritable rempart tendant à interdire l'accès du germe dans la cavité générale, sans toutefois l'empêcher de se produire.

La phagocytose, nulle ou presque nulle chez les vers à soie, fut légèrement plus manifeste dans le cas d'*Hyponomeuta* et nous avons trouvé çà et là dans la cavité générale des leucocytes contenant les bacilles en voie de digestion et aussi des images de bactériolyse extracellulaire.

Cette destruction extracellulaire partielle des bacilles dans le sang a été observée également sur les coupes et, aux endroits où elle était la plus intense, le plasma sanguin se présentait sous l'aspect d'amas grumeleux de coloration noirâtre.

Le plasma du sang qui se colore sur coupes chez les chenilles normales par l'éosine en une couche rose uniforme, se présentait chez les insectes fortement infectés sous l'aspect de grumeaux dispersés dans la cavité générale, faisant penser à une modification pathologique.

Nous avons observé dans la cavité générale, par endroits, des amas de leucocytes contenant ou non de petites quantités de pigment noir résultant vraisemblablement d'une destruction partielle des bacilles insuffisante pour arrêter la septicémie. Ces amas de leucocytes présentaient toujours un aspect irrégulier et nous n'avons vu ni plasmodes ni capsules caractérisant la défense de l'organisme dans les chenilles comme on en observe en cas d'injection dans leur cavité générale de germes peu pathogènes ou de substances inertes.

RÉSUMÉ.

En résumé on peut dire que :

B. cereus var. *alesti* s'avère virulent pour les chenilles de *Galleria melonella* et que son effet pathogène pour cet insecte consiste en une intoxication lente.

Cette intoxication est cependant inconstante dans le cas d'administration aux chenilles de *Galleria melonella* des cultures sur gélose.

Elle est plus forte et plus rapide, et pour ainsi dire constante, lorsque les chenilles sont nourries de poudre provenant du broyage des cadavres de vers à soie morts de flacherie infectieuse.

Les phénomènes histopathologiques qui l'accompagnent sont peu marqués. Dans aucun cas la septicémie n'a été observée chez les chenilles de *Galleria*.

Par contre, pour les chenilles d'*Hyponomeuta cognatella* qui sont beaucoup plus sensibles à l'effet de *B. cereus* var. *alesti*, la septicémie était la seule forme de l'infection constatée dans nos expériences et s'accompagnait de modifications histopathologiques variées dans les tissus de l'hôte, qui sont décrites dans ce travail.

Ce germe s'avère ainsi pathogène non seulement pour les vers à soie, qui sont insensibles à d'autres souches de *B. cereus* entomophytes (Toumanoff et Vago [4]), mais aussi pour les chenilles de deux autres Lépidoptères qui ont été utilisées pour nos expériences et chez lesquelles l'infection se manifeste par des symptômes tout à fait différents.

La première forme d'infection, celle de *Galleria* qui n'est suivie qu'inconstamment de la pullulation des bacilles dans le corps de l'insecte et uniquement *post mortem*, est particulièrement intéressante du point de vue de la pathologie des insectes en général.

On observe parfois, dans les conditions naturelles ou dans les élevages des chenilles de Lépidoptères, des épizooties dont il est difficile de définir la nature, en raison de l'absence dans le sang des insectes de bacilles avant la mort.

Il n'est pas exclu que certaines de ces mortalités soient dues à des infections difficiles à mettre en évidence.

Nos expériences démontrent aussi que l'action du même germe sur deux insectes ayant un régime alimentaire différent n'est pas la même, et l'on doit donc tenir compte de cet important facteur dans l'étude de la pathologie des insectes et la lutte bactériologique contre les insectes nuisibles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. METALNIKOV, I. ERMOLAEVA et SKOBELZYNE. Ces *Annales*, 1931, 46, 467.
- [2] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, 433, 1504.
- [3] C. TOUMANOFF et C. VAGO. Ces *Annales*, 1952, 83, 421.
- [4] C. TOUMANOFF et C. VAGO. Ces *Annales*, 1952, 83, 634.
- [5] C. TOUMANOFF et C. VAGO. Ces *Annales*, 1953, 84, 376.
- [6] C. TOUMANOFF et C. VAGO. Ces *Annales*, 1953, 84, 623.

- [7] E. STEINHAUS. *Principles of Insect Pathology*, 1949, Mc Graw Hill Co, New-York, London, Toronto.
- [8] E. STEINHAUS. *Hilgardia*, 1951, **20**, 359.
- [9] C. VAGO. *C. R. Acad. Agric.*, 1951, **37**, 593.

LÉGENDES DES PLANCHES

PLANCHE I. — Fig. 1 : Aspect de l'épithélium de l'intestin moyen d'*Hyponomeuta cognatella* Hb malade envahi par *B. cereus* var. *alesti*. On y voit un amas de bacille (*a*), entreposé entre la m. basale et le bord supérieur des cellules épithéliales ; *b* : les amas bacillaires en contact avec le bord inférieur de l'épithélium intestinal dont la bordure en brosse est détruite ; on ne voit d'autre part pas trace de membrane péritrophique, également détruite. L'épithélium fortement dégénéré est divisé en une série de cordons à noyaux disposés irrégulièrement et frappés de pycnose.

Fig. II : Une autre image de l'invasion de l'intestin moyen : *a* : amas bacillaire ; *g* : cellule en « gobelet » plus ou moins intacte où l'on note l'absence de bacilles dans la cavité de ces cellules. On remarque l'aspect anormal des noyaux. A droite on voit une « cellule en gobelet » détruite et fusionnée avec la cellule cylindrique voisine. En bas et à droite (*t*), nourriture et débris des cellules disloquées remplies de bacilles.

Fig. III : Fragment de l'intestin moyen avec pullulation de bacilles à l'intérieur des cellules cylindriques. On voit en haut et en bas les zones claires provoquées par la dislocation des cellules (*a* et *b*). les noyaux sont ronds, à chromatine compacte, attestant la pycnose.

Fig. IV : La pullulation bacillaire dans l'intestin postérieur : *m* : masses bacillaires en contact avec l'intime circulaire (*e*) qui présente l'aspect normal.

PLANCHE II. — Fig. 1 : Amas de leucocytes (*l*) dans la cavité générale de l'insecte ; on ne voit pas la phagocytose ; *b* : masse bacillaire.

Fig. II : Microphotographie montrant un endroit de la cavité générale où l'on observe la lyse bactérienne s'accompagnant de la formation du pigment noirâtre (*p*). On observe aussi au milieu de cette masse quelques bacilles en voie de lyse ou légèrement modifiés.

Fig. III : Coupe montrant les cellules détachées (*c*) de l'épithélium intestinal baignant dans la lumière de l'intestin moyen. (*p*) : bord inférieur de l'intestin ; on aperçoit les bacilles entre les cellules épithéliales détachées.

Fig. IV : L'accumulation de leucocytes en contact avec la couche musculaire externe de l'estomac (*a*) au niveau d'une forte pullulation bacillaire dans la lumière intestinale ; (*p*) paroi de l'intestin (trop intensivement colorée par l'hématoxyline) ; (*b*) : amas de bacilles.

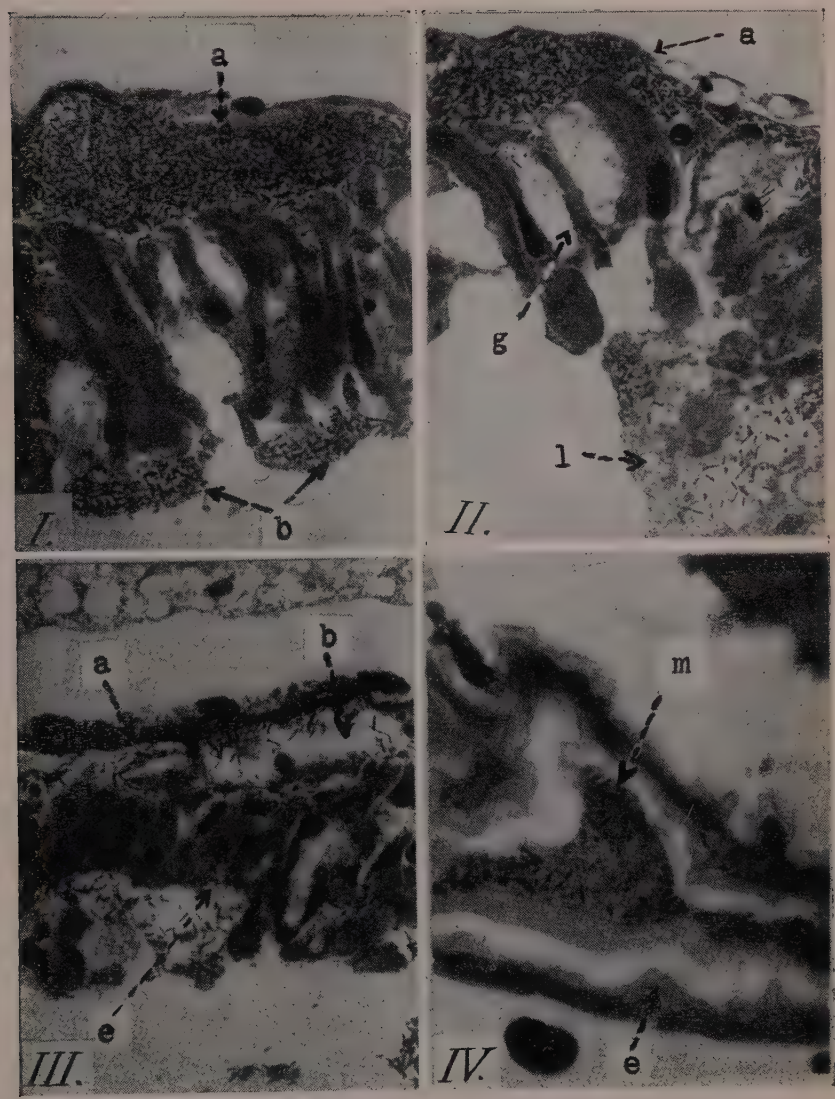


PLANCHE I.



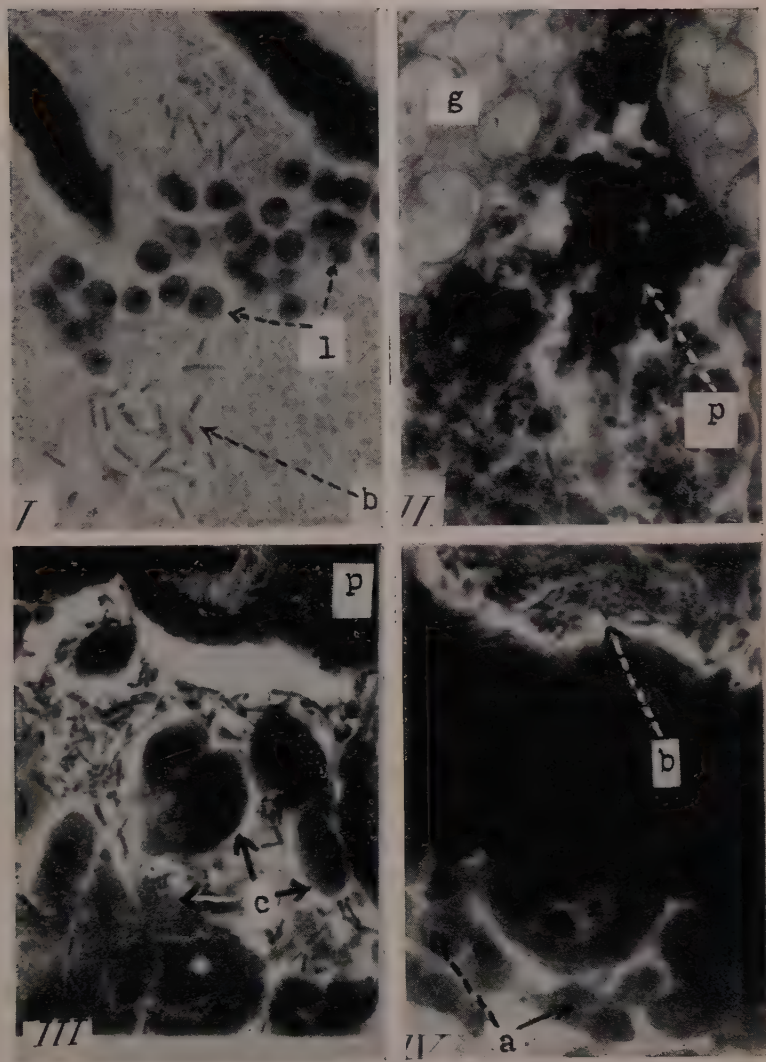


PLANCHE II.

CONDITIONS DE PERSISTANCE DU VIRUS POLIOMYÉLITIQUE DANS LE SUC GASTRIQUE HUMAIN

par G. BARSKI, A. MACDONALD (*) et P. SLIZEWICZ,
[avec la collaboration technique de J. de HERDT] (**).

(*Institut Pasteur, Service des Virus [D^r P. LÉPINE].*)

La résistance du virus de la poliomyélite aux différents facteurs physiques et chimiques, et en particulier aux changements de pH dans des limites très étendues, est bien connue.

Schultz et Robinson [1] ont établi, au cours d'une étude détaillée, que le virus peut résister dans une solution de chlorhydrate de cystéine, à un pH de 2,2. Loring et Schwerdt [2] ont trouvé le virus actif après vingt minutes de contact à la température ambiante à des pH allant jusqu'à 1,6. D'après Faber et Dong [3], une suspension de la souche Lansing du virus est inactivée en cinq minutes à 37° C à un pH de 1,0, mais résiste partiellement pendant deux heures à un pH de 2,0.

Remarquons que la conception selon laquelle le tube digestif constitue la voie habituelle de pénétration du virus poliomyélitique dans l'organisme [4] implique son passage à travers la barrière de l'acidité gastrique. Cette conception, généralement adoptée, a été pourtant mise en doute récemment encore par H. K. Faber et ses collaborateurs [5, 6] qui admettent le passage direct du virus, après ingestion, de la région buccale et pharyngée vers les ganglions nerveux régionaux.

Le but de ce travail a été d'établir explicitement les conditions de survie du virus poliomyélitique dans le suc gastrique humain, et par là de déterminer les conditions de son passage à travers l'acidité gastrique en fonction des fluctuations physiologiques et pathologiques de cette dernière.

Matériel et technique.

SUCS GASTRIQUES.

Les sucs gastriques ont été prélevés à jeun par tubage après injection sous-cutanée d'histamine d'après la technique cou-

(*) Adresse actuelle : University of Liverpool, Dpt. of Bacteriology.

(**) *Société Française de Microbiologie*, Séance du 4 mars 1954.

rante (1). Les sujets, en vue des prélèvements, ont été choisis au hasard et, sur un total de 19 individus, 5 seulement présentaient des affections pouvant intéresser directement la sécrétion gastrique (voir tableau I). L'âge des malades variait entre 20 et 74 ans. Dans presque tous les cas nous avons soumis à l'expérimentation avec le virus deux prélèvements par sujet, effectués respectivement quinze et quarante-cinq minutes après l'injection provocante d'histamine.

Nous avons récolté en tout 37 échantillons différents de suc gastrique. Nous déterminons, pour tous ces échantillons, sauf quelques exceptions, la teneur en HCl libre, le pH du suc gastrique à l'origine et le pH du mélange suc gastrique-virus (pH-mètre avec électrode de verre type Karridge).

VIRUS.

La plupart des essais ont été effectués avec la souche Mahoney du groupe antigénique I, le plus fréquemment rencontré dans la poliomyélite clinique, en Europe [7] comme ailleurs [8]. Dans deux séries d'expériences nous avons, en plus, effectué des essais avec les deux autres types antigéniques : la souche MEF1 (type II) et la souche Saukett [type III] (2).

Les essais d'inactivation du virus avec les sucs gastriques ou accessoirement avec le milieu de culture acidifié (voir plus loin) ont été faits uniformément par incubation pendant trente minutes à 37° C d'un mélange à parties égales de suc gastrique et de suspension virulente. Ce mélange a été ensuite dilué cinq fois avec le milieu de culture avant son inoculation dans les cultures cellulaires qui servent pour détecter la présence du virus actif. La concentration originale de la suspension virulente a été calculée de façon à obtenir finalement environ 1 000 doses infectantes pour 11 gouttes d'inoculum.

CULTURE DES TISSUS.

Pour la mise en évidence du virus, nous utilisons son effet cytopathogène en cultures cellulaires *in vitro*. La sensibilité de

(1) Nous désirons exprimer ici nos vifs remerciements au professeur agrégé Charles Debray et à son collaborateur le Dr Laure pour l'aide qu'ils nous ont apportée à l'hôpital Vaugirard dans l'obtention des sucs gastriques.

(2) Les trois souches de virus utilisées proviennent du Laboratoire du Dr Jonas Salk. Elles sont entretenues depuis 1952 au Service des Virus de l'Institut Pasteur par passages sur cultures cellulaires (7 passages pour la souche Mah., 21 passages pour la souche MEF1 et 8 passages pour la souche Sauk.) La virulence *in vivo* du septième passage de la souche Mah. utilisée dans ce travail a été vérifiée sur le singe (cercopitèque).

cette méthode peut être considérée, à l'heure actuelle, comme comparable à celle obtenue avec les inoculations à l'animal [9].

Au cours de ce travail nous avons utilisé surtout des cultures de lignées cellulaires obtenues à partir du tissu sous-cutané musculaire prélevé à l'autopsie d'enfants prématurés. Les détails concernant la technique de culture de ces lignées cellulaires repiquables, ainsi que la sensibilité de ces cultures au virus ont fait l'objet d'un travail récent [10]. Mentionnons seulement que le milieu de culture définitif, utilisé pour l'incubation des cultures cellulaires en présence du virus, est le milieu recommandé par Enders [11], nommé plus loin ME et composé de 90 p. 100 de liquide amniotique de vache, de 5 p. 100 de sérum de cheval et de 5 p. 100 d'extrait embryonnaire de bovin (3). Le même milieu est employé pour toutes les dilutions de virus, de suc gastrique et également pour les solutions témoins d'acide chlorhydrique.

On ajoute au milieu 200 U. de pénicilline et 50 μ g de streptomycine par centimètre cube, ce qui, pratiquement, suffit pour entraver toute infection bactérienne provenant du suc gastrique. Des *Monilia* d'origine gastrique qui sont apparues dans deux cas au cours de nos cultures sont peu pathogènes pour les cellules et n'entravent pas sur celles-ci l'action du virus.

Résultats.

L'essentiel de nos expériences porte sur des essais effectués avec le virus poliomyélitique du type I (souche Mahoney) incubé pendant une demi-heure, à la température de l'étuve, en présence de 37 échantillons différents de suc gastrique humain. Nous avons employé en général des sucs gastriques fraîchement prélevés. Par la suite, nous avons constaté que leur acidité et leur pouvoir virulicide ne subissent pas de modifications sensibles si on les conserve plusieurs semaines à + 4° C.

Les essais ont été groupés en quatre séries expérimentales exécutées dans des conditions strictement comparables. Pour chaque échantillon, des témoins sans virus ont servi à vérifier l'éventualité d'une action non spécifique du suc gastrique sur les cultures cellulaires. Dans aucun des 37 cas étudiés une telle action n'a été enregistrée.

Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau I. Le résultat définitif est obtenu par l'observation des cultures le sixième jour après l'introduction du mélange virus-

(3) L'extrait embryonnaire de bovin est préparé et stocké d'après la technique précédemment décrite.

Le liquide amniotique nous est fourni commercialement par les Laboratoires Renard, 32, rue Henri-Barbusse, Clichy (Seine).

TABLEAU I.

Dans ce tableau comme dans les tableaux II et III, la teneur en HCl libre est exprimée en g 1 000 cm³.

L'effet cytopathogène spécifique est marqué de la façon suivante :

0, cultures normales (absence de virus); +, quelques signes de destruction cellulaire spécifique; ++, destruction importante de la culture; +++, destruction totale.

Sujet	Age et sexe	mn après injection d'histamine	Diagnostic	pH (10,1) du suc gastrique pur	pH (10,1) du mélange suc gastr. + virus	HCl libre dans le suc gastrique	Présence du virus après incubation de 30 mn à 37° avec le suc gastrique					
							31.		41.		61.	
1.	Fr. ♂	50	15	érythémat.	5,0	7,0	0	++	++	+++	+++	+++
2.	Fr. "	45	"	"	6,6	7,1	0	++	+	+++	+++	+++
3.	Va. ♂	51	15	contusions	1,8	6,0	0,51	0	+	+	+	+++
4.	Va. "	45	"	"	1,5	1,9	2,92	0	0	0	0	0
5.	Cl. ♂	74	15	ostéomyél. chronique	1,8	5,7	0,42	++	+	+++	++	+++
6.	Cl. "	45	"	"	1,7	2,2	1,16	+	0	++	+	++
7.	Ze. ♂	65	15	hernie ing. bilatérale	1,6	1,8	2,62	0	0	0	+	+
8.	Ze. "	45	"	"	2,0	3,0	1,02	+	+	+++	++	+++
9.	M.P. ♂	70	15	entorse	1,3	2,0	2,70	0	0	0	0	0
10.	M.P. "	45	"	"	1,6	1,9	3,75	0	0	0	0	0
11.	Cre. ♂	55	15	hernie			0,45	0	0	+	+	+++
12.	Cre. "	45	"	"		1,7	2,70	0	0	0	0	0
13.	L.A. ♂	45	15	ulcère variqueux	1,8	2,0	2,04	0	0	0	0	0
14.	L.A. "	45	"	"	1,9	2,1	2,19	0	0	0	0	0
15.	B.M. ♂	29	15	polype rectal	1,7	1,9	2,84	0	0	0	0	0
16.	B.M. "	45	"	"		1,7	3,79	0	0	0	0	0
17.	C.P. ♂	71	15	hernie	6,4	7,0	0	+	+	+	+++	+++
18.	C.P. "	45	"	"	4,5	6,1	0	++	++	++	+++	+++
19.	B.B. ♂	20	15	adénite axillaire		1,5	2,77	0	0	0	0	0
20.	B.B. "	45	"	"	1,4	2,0	3,5	0	0	0	0	0
21.	L.J. ♂	49	15	gastrite	2,5	3,6	0,21	+	0	+	+	+++
22.	L.J. "	45	"	"	3,3	4,6	0,21	+	+	++	++	+++
23.	S.J. ♂	49	15	contusions	1,6	2,0	2,70	0	0	0	0	+
24.	St.J. ♂	?	15	?	7,0	7,1	0	++	+	++	+++	+++
25.	St.J. "	45	"	"	5,9	8,0	0	+	+	++	++	+++
26.	L.R. ♂	47	15	ulcère	1,9	2,0	1,31	0	0	+	+	+
27.	L.R. "	45	"	"		2,1	2,19	0	+	0	+	+
28.	G.E. ♀	47	15	métrite	4,0	6,6	0	0	0	+	++	+++
29.	G.E. "	45	"	"	6,6	7,4	0	0	0	+	+	++
30.	H.Y. ♀	46	15	gastrite	1,6	2,4	1,38	0	0	0	0	+
31.	H.Y. "	45	"	"	1,5	2,0	2,19	0	0	0	0	0
32.	Cha. ♀	28	15	salpingite	1,8	2,9	0,21	0	0	0	+	++
33.	Cha. "	45	"	"	1,6	2,8	1,31	+	0	+	0	++
34.	Co. ♀	53	15	lithiase vésiculaire	1,5	2,0	2,19	0	0	0	0	0
35.	Co. "	45	"	"	1,5	2,0	3,28	0	0	0	0	0
36.	Em. ♀	45	15	?	6,6	7,6	0,19	+	+	++	++	+++
37.	Em. "	45	"	"	3,7	7,2	0,21	+	+	+	+	+++

suc gastrique ; de plus, les observations faites les troisième et quatrième jours, permettent de mettre en évidence une action nuancée du virus qui peut correspondre à son inactivation partielle.

Dans l'ensemble, l'inactivation du virus apparaît comme une

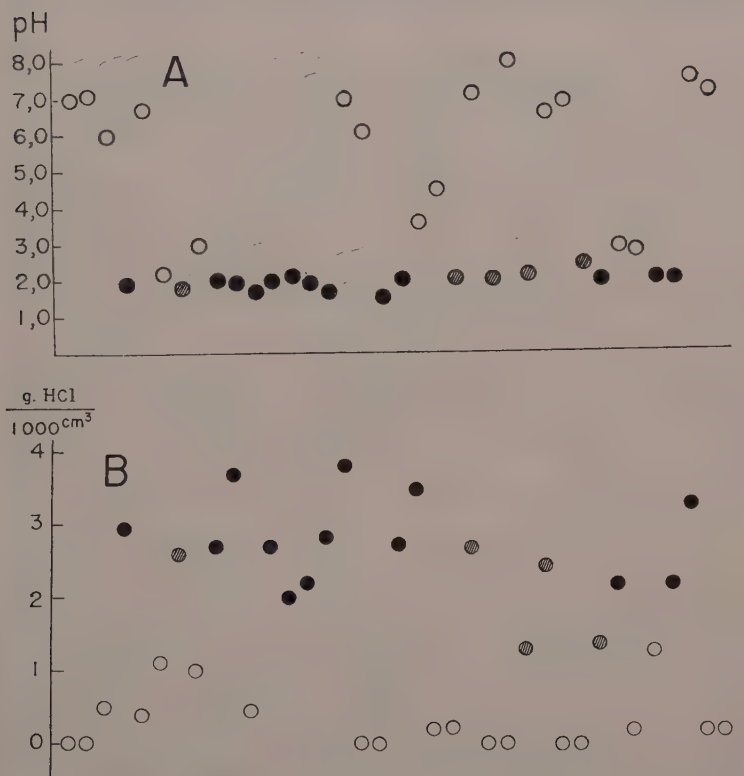


FIG. 1. — A, distribution des valeurs de pH du mélange suc gastrique-virus, pour 36 échantillons de suc gastrique; B, distribution de valeurs d'acidité (g HCl/1 000 cm³) de 32 échantillons de sucs gastriques.

Cercle noir : inactivation complète du virus en une demi-heure à 37° C ; cercle grisé : inactivation partielle du virus en une demi-heure à 37° C ; cercle blanc : aucune action décelable sur le virus.

fonction de l'acidité du suc gastrique. Sur la figure 1, cette dépendance par rapport au pH et à la teneur en HCl libre du suc gastrique apparaît clairement.

Comme nous le voyons, les sucs gastriques peuvent être groupés en trois catégories.

1° Dans 13 cas sur 37 les sucs gastriques à la dilution de 1 : 1 détruisent en une demi-heure, à 37° C. des doses massives de virus. Il s'agit de sucs gastriques ayant à l'origine une teneur en acide chlorhydrique libre variant entre 2,04 et 3,75 g/1 000 cm³ (moyenne 2,90) et un pH compris entre 1,3 et 1,9 (moyenne 1,55), le pH définitif du mélange virus-suc gastrique étant de 1,5 à 2,2 (moyenne 1,9).

2° La deuxième catégorie comprend 5 échantillons de sucs gastriques dont la teneur en HCl va de 1,31 à 2,70 (moyenne 2,05) et le pH de 1,5 à 1,9 (moyenne 1,65). Le pH du mélange virus-suc gastrique est de 1,8 à 2,4 (moyenne 2,05). Dans ces conditions, le virus n'est que partiellement inactivé.

3° Dans la troisième catégorie se placent 19 échantillons de sucs gastriques dont la teneur en HCl libre varie entre 0 et 1,31 g/1 000 cm³ et le pH varie entre 1,6 et 7,0 (moyenne 4,0). Le pH du mélange virus-suc gastrique est compris entre 2,2 et 7,6 (moyenne 5,7). Ces sucs gastriques n'exercent, dans les conditions de nos expériences, aucune action inactivante sur le virus.

L'aptitude du suc gastrique à détruire le virus ne dépend visiblement pas de l'âge du malade ni de son état général. En effet, on trouve dans les première et deuxième catégories (inactivation partielle ou complète du virus) des représentants de groupes d'âge différents et de types d'affections divers intéressant ou non la sécrétion gastrique.

On doit souligner que, chez les mêmes malades (voir tableau I, sujet Va., cas n° 3-4, sujet Gre., cas n° 11-12 et sujet He. Y., cas n° 30-31), dans le premier prélèvement du suc gastrique, effectué quinze minutes après l'injection d'histamine, le virus résiste complètement ou partiellement, tandis qu'il est totalement détruit dans le deuxième prélèvement effectué quarante-cinq minutes après cette injection. Dans ces trois cas, à ce changement d'action du contenu gastrique sur le virus, correspond une augmentation très nette de sa teneur en acide chlorhydrique, respectivement de 0,51 à 2,92 g/1 000 cm³, de 0,45 à 2,70 g/1 000 cm³ et de 1,38 à 2,19 g/1 000 cm³.

Le rôle essentiel que joue l'acidité dans le phénomène de destruction du virus est confirmé par une série d'expériences où plusieurs échantillons de sucs gastriques ayant une acidité élevée ont été amenés à une réaction neutre à l'aide du NaOH 1N. L'incubation du mélange virus-suc gastrique (neutralisé avec NaOH ou non) se fait dans les mêmes conditions que précédemment. Le tableau II résume les résultats de ces expériences.

Comme nous le voyons, la neutralisation de l'acidité du suc gastrique supprime nettement son pouvoir virulicide.

Au cours d'essais parallèles nous avons remplacé, pour l'incuber avec le virus, le suc gastrique par le milieu de culture (ME) acidifié

TABLEAU II.

Sujet	pH du suc gastrique à l'origine (±0,1)	HCl libre dans le suc gastrique à l'origine	Présence du virus après incubation de 30 mn à 37° avec le suc gastrique					
			Avant neutralisation avec NaOH			Après neutralisation avec NaOH		
			3i.	4j.	6i.	3i.	4j.	6i.
1. B.B.	1,5	2,77	0 0	0 0	0 0	+ 0	++ +	+++ ++
2. B.B.	1,4	3,5	0 0	0 0	0 0	0 0	+ +	+++ +++
3. C.J.	1,6	2,70	0 0	0 +	+ +	0 0	0 0	++ ++
4. L.R.	1,9	1,84	0 0	+ +	+ ++	0 0	+ +	++ +++
5. L.R.		2,84	0 +	0 +	+ ++	0 0	0 +	+++ +++
6. H.Y.	1,6	1,38	0 0	0 0	+ ++	+ +	+ +	++ ++
7. H.Y.	1,5	2,19	0 0	0 0	0 0	+ +	+ +	++ ++
8. C.O.	1,5	2,19	0 0	0 0	0 0	+ +	++ ++	++ ++
9. C.O.	1,5	3,28	0 0	0 0	0 0	+ +	++ ++	+++ +++

avec de l'acide chlorhydrique. Par ailleurs, les conditions d'expérience restent rigoureusement semblables aux précédentes.

Ces essais nous montrent que le virus (souche Mahoney) à la concentration habituelle (1 000 doses infectantes par inoculum) n'est détruit dans un mélange virus-ME, après une demi-heure à 37° C, qu'à un pH de 1,6-1,65 ou plus bas, ce qui correspond à une teneur minimum en acide chlorhydrique dans le milieu avant dilution avec le virus de 3,14 g/1 000 cm³. Le pH de 1,7-1,75 réalise dans ces conditions une inactivation partielle du virus. Un pH de 1,8 ou plus élevé, qui correspond à une teneur en HCl du milieu avant dilution de 2,40 g/1 000 cm³ ou moins, n'exerce sur le virus aucune action décelable. Si on prolonge le temps d'incubation jusqu'à une heure, le pH limite efficace est de 1,9-2,0.

Dans un milieu artificiellement acidifié avec de l'acide chlorhydrique, l'acidité nécessaire pour produire l'inactivation du virus exprimée en valeur du pH et en teneur en HCl apparaît par conséquent comme quelque peu au-dessus des valeurs moyennes efficaces dans le suc gastrique.

Afin de généraliser ces résultats, nous avons étendu nos expériences à deux autres souches de virus poliomyélique appartenant aux types II et III.

Dans des conditions analogues, 3 souches-types du virus, les souches Mahoney, MEF1 et Saukett, ont été mises simultanément en présence de 4 sucs gastriques différents ayant un pH respectif

de 1,6, 2,3, 1,8 et 1,6. Les suspensions virulentes introduites contenaient, avant l'incubation avec les suc gastriques, environ 1 000 doses infectantes pour chacun des virus étudiés. Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau III.

TABLEAU III.

Sujet	Temps (mn)	pH ($\pm 0,1$) du suc gastrique pur	pH ($\pm 0,1$) du mélange suc gastr. + virus	HCl libre dans le suc gastrique	Présence du virus après incubation de 30 mn à 37° avec le suc gastrique <u>6j. après introduction du virus</u>					
					Mahoney	MEFl	Saukett			
1. Coll.	15	1,6	2,2	2,19	0	0	0	0	0	0
2. Chap.	45	2,3	4,4	1,31	+++	++	++	++	+++	++
3. Herr.1	15	1,8	2,8	1,38	+	+	+++	+	+	++
4. Herr.2	45	1,6	2,0	2,9	0	0	0	0	0	0
Mélange suspensions virulentes témoins + milieu de culture (pH $\pm 7,6$)					+++	+++	+++	+++	+++	+++

Comme on le voit, l'inactivation de deux autres souches du virus appartenant aux types antigéniques II et III s'opère dans les mêmes conditions que celle observée pour la souche Mahoney (type I).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Il est généralement admis que la composition du suc gastrique prélevé par tubage après un repas d'épreuve ou après une injection provocante d'histamine reflète d'une façon suffisamment fidèle sa composition dans les conditions physiologiques. Ce fait nous autorise à établir une analogie entre les résultats d'incubation *in vitro* du virus poliomyélitique en présence de suc gastrique humain et le sort que doit subir le virus ingéré par l'homme au cours de contaminations naturelles.

Cette extension nous paraît d'autant plus plausible que nous avons employé au cours de ce travail des doses massives de virus qui dépassent très vraisemblablement les doses qu'on peut rencontrer dans la pratique. En outre, les conditions d'incubation : trente minutes à 37° C avec un suc gastrique dilué deux fois, sont plutôt moins sévères que les conditions naturelles de digestion gastrique.

Nous pouvons donc conclure que le passage du virus à travers le barrage de l'acidité gastrique est possible (19 cas sur 37), à condition que cette acidité n'atteigne pas le taux physiologique maximum. Autrement dit, le passage du virus actif à travers ce barrage, bien que possible, n'est pas toujours assuré, étant soumis

chez l'homme (4) aux variations naturelles du taux de cette acidité.

Nous avons vu, par exemple, dans 3 cas, que chez le même individu le virus peut être soit détruit dans le suc gastrique, soit y résister et cela en fonction des modifications d'activité sécrétoire de la muqueuse gastrique qui se produisent en l'espace d'une demi-heure.

Ces observations font penser à une adaptation biologique assez stricte du virus poliomyélitique aux conditions de son parasitisme chez l'homme. Il est, en effet, frappant de voir que la zone critique de résistance du virus aux pH acides se superpose exactement à la zone des fluctuations physiologiques de l'activité gastrique chez l'homme.

Les facteurs qui règlent cette activité sécrétoire peuvent, par conséquent, déterminer les chances d'inactivation du virus dans l'estomac. Le virus poliomyélitique a par exemple plus de chances d'échapper à cette inactivation quand il est absorbé avec de l'eau ou avec des aliments, tels le lait ou la crème, qui abaissent la sécrétion gastrique, qu'il n'en a quand il est absorbé au cours d'un repas complet donnant lieu à une sécrétion gastrique plus intense. D'autres facteurs influençant la digestion gastrique : le volume et la consistance de la masse alimentaire par exemple, peuvent également jouer leur rôle.

Il sera intéressant, à cet effet, de rappeler que Sabin [12] n'a pu régulièrement infecter par voie orale des singes avec la souche YSK qu'à condition de leur faire préalablement absorber du lait. Récemment Gebhardt et Bachtold [13] ont obtenu des résultats analogues avec la souche Mahoney en faisant absorber aux singes le virus avec de la crème de lait.

Ainsi que nous le voyons d'après des expériences parallèles au cours desquelles le virus a été incubé dans un milieu acidifié artificiellement avec de l'acide chlorhydrique, le taux limite d'acidité (5) permettant la destruction du virus dans ce milieu se trouve légèrement supérieur au taux moyen efficace obtenu avec les sucs gastriques. Il faut donc autant ou plus d'acide chlorhydrique dans un milieu artificiel qu'il n'en faut en moyenne dans le suc gastrique pour détruire le virus. Il n'est pas exclu que l'action du suc gastrique sur le virus ait un caractère complexe, et qu'à l'action propre de l'acide chlorhydrique s'ajoutent en l'amplifiant d'autres facteurs tels que la digestion pepsique par exemple ou peut-être aussi l'action de certaines mucoprotéines de la muqueuse gastrique [14].

(4) Le cas de nourrissons présentant une acidité gastrique normale beaucoup plus basse mis à part.

(5) Ces valeurs concordent bien dans l'ensemble avec les résultats obtenus par d'autres auteurs [1, 2, 3].

La théorie de Faber et collaborateurs [5, 6] sur le cheminement du virus poliomyélitique directement de la région pharyngée vers les ganglions nerveux craniens, n'est ni confirmée ni infirmée par nos résultats.

Pourtant, la théorie classique émise par Kling, Levaditi et Lépine [4] et qui implique le transit du virus à travers le tube digestif s'enrichit des précisions concernant les modalités et les conditions de ce passage.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. W. SCHULTZ et F. ROBINSON. *J. inf. Dis.*, 1942, **70**, 193.
- [2] H. S. LORING et C. E. SCHWERDT. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1944, **57**, 173.
- [3] H. K. FABER et L. DONG. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1946, **63**, 575.
- [4] C. KLING, C. LEVADITI et P. LÉPINE. *Bull. Acad. Méd.*, 1929, **102**, 158.
- [5] H. K. FABER, R. J. SILVERBERG et L. DONG. *J. exp. Med.*, 1951, **94**, 455.
- [6] H. K. FABER, R. J. SILVERBERG et L. DONG. *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 69.
- [7] P. LÉPINE, G. BARSKI, M. ENDO et J. BLUSSON. *Bull. Acad. Méd.*, 1954, **138**, 50.
- [8] Committee on Typing of the National Foundation for Infantile Paralysis. *Am. J. Hyg.*, 1951, **54**, 191.
- [9] N. LEDINKO et J. L. MELNICK. *Am. J. Hyg.*, 1953, **58**, 223.
- [10] G. BARSKI, P. DE SOUZA, V. MONACI, M. ENDO et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1953, **85**, 576.
- [11] J. F. ENDERS. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1953, **82**, 100.
- [12] A. B. SABIN. *Am. J. publ. Health*, 1951, **41**, 1215.
- [13] L. P. GEBHARDT et J. G. BACHTOLD. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1953, **83**, 807.
- [14] B. MANDEL et E. RACKER. *J. exp. Med.*, 1953, **98**, 399.

LES EFFETS INHIBITEURS DES PHAGES SUR LA CROISSANCE DES CULTURES BACTÉRIENNES ET LA NOTION D'EFFICACITÉ D'UNE RACE DE PHAGES SUR UNE SOUCHE DE BACTÉRIES

par R. WAHL.

[avec la collaboration technique de G. MARTIN-MONCEAUX] (*).

(Institut Pasteur.)

Les essais de traitement par les phages des infections de l'homme et des animaux n'ont pas donné jusqu'ici ce qu'en attendait d'Hérelle. Aussi beaucoup d'auteurs ont-ils soutenu que les phages étaient inactifs dans le sang ou dans les tissus. Cependant les expériences de Dubos, Straus et Price [1]; de Morton et Perez-Otero [2], de Wahl et Terrade [4, 12] ont démontré que les phages peuvent se multiplier dans un organisme infecté, donc lyser des bactéries.

Encore faut-il, pour que les phages produisent un effet utile dans une infection, qu'ils lysent, sinon toutes les bactéries présentes, au moins un très grand nombre d'entre elles, et cela dans un délai assez court pour que la multiplication des bactéries survivantes ne rende pas la lyse inopérante. Cela dépend évidemment du nombre des bactéries présentes, des possibilités de rencontre des phages et des bactéries, etc. ; mais nous avons observé que, toutes choses étant égales d'ailleurs, les différentes espèces de phages avaient *in vivo* une action plus ou moins grande suivant leur race. Il y a là un caractère spécifique propre à chaque race de phages. Nous allons voir qu'un caractère analogue du phage se retrouve *in vitro* et qu'il peut servir à choisir les phages les plus appropriés à des essais thérapeutiques. Nous pouvons le mettre en évidence comme l'ont montré Wahl et Terrade en étudiant, dans des cultures en milieu liquide, les actions des phages considérées non pas individuellement, mais à l'échelle des populations. Nous verrons à la discussion que les cultures sur gélose ne conviennent pas pour cette recherche.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 février 1954.

I. — DÉFINITIONS.

La plupart des phages actifs sur une souche produisent sur les cultures de cette souche des lyses, des ralentissements ou des arrêts de croissance dont l'intensité est d'ailleurs très variable. Quelques phages cependant ne paraissent pas modifier ou même accélèrent la croissance des cultures en milieu liquide d'une souche, sur laquelle ils ont pourtant un titre élevé (le titrage étant fait par numération des plages sur gélose). Ces cas, qui feront l'objet d'une publication ultérieure, sont en dehors de notre sujet, puisqu'il ne peut pas être question, en l'occurrence, d'effet inhibiteur du phage.

Si l'on n'en tient pas compte, on peut dire que, à la suite de l'introduction d'un certain nombre de phages, actifs sur les bactéries, dans une population bactérienne en cours de croissance, les bactéries « réceptives » sont plus ou moins rapidement infectées et lysées ; mais, le plus souvent, certaines bactéries « réfractaires » (1) à l'infection survivent et se multiplient. En outre, les choses se compliquent du fait que, comme nous l'avons montré, une partie de ces bactéries réfractaires et de leur descendance peut subir à son tour, de la part des phages, des actions *secondaires* dont nous discuterons plus loin la nature.

Nous appellerons effet inhibiteur total du phage ou, par abréviation, « effet *inhibiteur du phage* » sur une culture, la somme de toutes ces actions successives, échelonnées, qui commencent par la lyse des bactéries réceptives présentes au départ et continuent jusqu'à la fin de la croissance. Nous dirons que toute bactérie qui a subi l'action des phages a fait une *rencontre efficace avec un phage*, ce qui exige qu'elle soit réceptive à ce phage. Tout phage capable d'avoir une rencontre efficace avec les bactéries réceptives d'une souche est un phage *actif* sur cette souche.

L'effet inhibiteur des phages est fonction de bien des facteurs : composition du milieu, nombres respectifs des phages et des bactéries, etc., mais aussi d'un certain facteur propre à l'espèce de phage considérée, caractérisant son action sur la souche de bactéries en cause, et que nous appellerons *l'efficacité du phage vis-à-vis de la souche*. En effet, si l'on prépare une série de populations bactériennes identiques placées exactement dans les mêmes conditions et si l'on introduit au même moment dans

(1) Nous nous sommes expliqué ailleurs sur ces dénominations. Les bactéries « réfractaires » à un phage sont pour nous celles qui survivent à la lyse des bactéries « réceptives ». Nous verrons plus loin la différence avec les bactéries « sensibles », « résistantes » et semi-résistantes » [6, 9].

chacune d'elles des phages de races différentes, on constate que chaque race de phage produit un effet inhibiteur d'intensité différente.

Pour que cette notion d'efficacité soit utilisable, il faut la définir quantitativement, c'est-à-dire comme l'intensité de l'effet inhibiteur d'un phage sur la souche considérée, dans des conditions standard en ce qui concerne tous les autres facteurs dont cet effet dépend. Pour cela, il faut préalablement :

a) Etablir une échelle de comparaison permettant d'évaluer quantitativement l'effet inhibiteur des phages sur les cultures.

b) Préciser l'action respective sur cet effet inhibiteur des différents facteurs dont il dépend. C'est ce que nous allons essayer de faire.

II. — EVALUATION DE L'EFFET INHIBITEUR DES PHAGES SUR LES CULTURES.

L'effet inhibiteur d'une quantité donnée d'un phage sur une culture de bactéries est indiqué par l'évolution de la culture à partir du temps d'introduction des phages, c'est-à-dire par la courbe des concentrations des bactéries viables en fonction du temps. Les numérations de bactéries doivent être faites en présence de sérum antiphage, pour éviter l'infection de nouvelles bactéries après le prélèvement.

Pour simplifier l'exposé, nous prendrons d'abord comme exemple le cas où les phages sont assez nombreux pour que la probabilité de rencontre dans les premières minutes, de chaque bactérie avec un phage au moins soit voisine de l'unité (nous dirons pour abrégé que les phages sont « en excès »). Nous généraliserons ensuite les résultats obtenus en les appliquant aux cas où les phages ne sont pas en excès.

1° EFFET INHIBITEUR DES PHAGES UTILISÉS EN EXCÈS.

Il s'exerce en deux étapes : l'une caractérisée par la lyse primaire des bactéries réceptives présentes au départ ; l'autre, où se succèdent les actions secondaires des phages sur les bactéries survivantes et sur leur descendance. Il dépend donc d'une part de la proportion de phages actifs et de bactéries réceptives en présence dans l'état initial ; et d'autre part de cette proportion à chaque instant de l'évolution de la culture secondaire.

On peut distinguer quatre types d'effet inhibiteur, répondant chacun à un ordre de grandeur différent de cet effet. A l'intérieur d'un même type, on peut encore apprécier des différences dans l'intensité de l'effet inhibiteur.

1° L'EFFET INHIBITEUR DU 1^{er} TYPE EST LE PLUS ATTÉNUÉ. — La lyse primaire, porte sur un trop petit nombre de bactéries pour

être visible. La croissance des bactéries réfractaires commence d'emblée : elle est continue. L'action lytique primaire du phage n'est pas plus intense que ses actions secondaires, de sorte que les deux étapes de l'inhibition ne peuvent pas être distinguées l'une de l'autre, même par des numérations de bactéries viables. Dans ce type, l'intensité de l'effet inhibiteur est indiquée par la forme de la courbe de croissance. L'effet est d'autant plus marqué que la courbe s'éloigne plus d'une exponentielle. Les phages actifs ou les bactéries réceptives sont très peu nombreux ; pen-

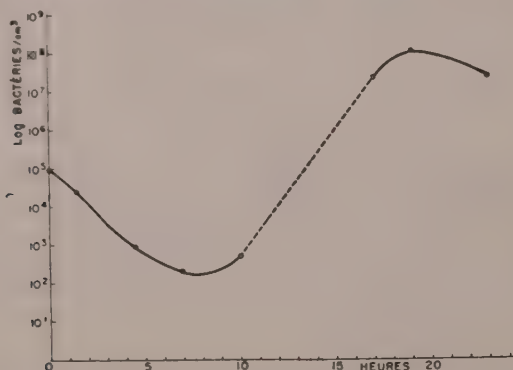


FIG. 1. — Effet inhibiteur du deuxième type : lyse primaire suivie immédiatement d'une culture secondaire, qui est ici résistante, à croissance logarithmique.

Nota. — Toutes les cultures ont été infectées au temps 0 par des phages en excès. Les numérations des bactéries viables sont faites en présence de sérum antiphage.

dant toute l'évolution de la culture, la plupart des rencontres entre bactéries et phages sont donc inefficaces.

2° L'EFFET INHIBITEUR DU 2° TYPE EST PLUS MARQUÉ QUE LE PRÉCÉDENT. — L'évolution comporte deux phases. La première phase répond à la lyse primaire qui est plus ou moins complète, mais nettement repérable. Elle est visible si la population bactérienne était assez dense à l'origine pour opacifier le milieu ; sinon la numération des bactéries viables permet de la repérer. La croissance secondaire suit immédiatement la lyse et représente la seconde phase (fig. 1).

Elle est modifiée ou non par les actions du phage (elle ne l'est pas sur la courbe de la fig. 1). Ces actions quand elles existent la ralentissent et la limitent. Dans ce type, l'intensité de l'effet inhibiteur est indiqué par l'importance des actions primaires et secondaires du phage. Pour produire un effet du 2° type, il faut que

les phages actifs soient assez nombreux pour que chaque bactérie puisse en rencontrer un ; et que les bactéries réceptives soient relativement nombreuses, mais moins que dans le type suivant.

3° L'EFFET INHIBITEUR DU 3° TYPE EST ENCORE PLUS INTENSE. — L'évolution comporte trois phases (fig. 2, 3 et 4) :

a) *Une phase de lyse primaire*, qui est ici toujours massive, subtotale. Comme dans le 2° type, elle est, suivant la concentration des bactéries, soit visible, soit repérable par la numération des bactéries viables.

b) *Une seconde phase, stationnaire* qui, si la population bactérienne n'était pas assez dense pour opacifier le milieu, prend l'apparence d'une phase latente prolongée, d'un retard d'apparition de la culture, pendant lequel le milieu reste clair. La durée de cette phase est très variable. Elle peut être limitée à quelques heures, pendant lesquelles le nombre des bactéries est constant à

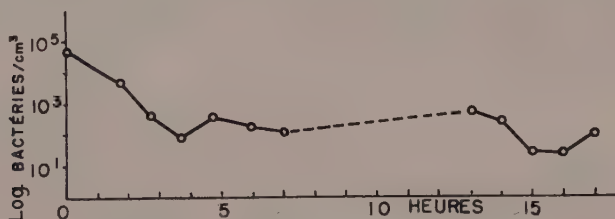


FIG. 2. — Effet inhibiteur du troisième type : lyse primaire, phase stationnaire, culture secondaire semi-résistante, avec seconde lyse et reprise de croissance. Voir nota figure 1.

toutes les numérations (bactériostase apparente ou réelle des bactéries survivantes). Elle peut aussi durer plusieurs jours (en réalité dans ce second cas les numérations montrent souvent une croissance très lente de la culture, après une phase complètement stationnaire).

c) *Une phase de croissance secondaire*. — Cette croissance est toujours perturbée par les actions des phages. La courbe de croissance présente des ralentissements, des arrêts et parfois même des parties descendantes (fig. 2). La croissance peut être prolongée bien au-delà des délais normaux ; finalement elle peut se terminer de deux façons différentes : ou bien, et c'est le cas le plus fréquent, elle est limitée à une valeur parfois très inférieure à celle d'une culture normale (fig. 3) ; ou bien, rarement, au bout d'un temps plus ou moins long, elle reprend en prenant le type exponentiel et atteint finalement l'opacité normale (fig. 4).

L'intensité de l'effet inhibiteur du 3° type est évaluée d'après celle des actions dont il est la somme : action lytique primaire ;

actions secondaires (retard, ralentissement et limitation de la croissance), proportionnelles respectivement à la durée du retard (longueur de la phase stationnaire), au degré de ralentissement (temps pendant lequel se prolonge la croissance) et au degré de limitation (inverse de la densité optique finale). Comme dans le type précédent, les phages actifs sont assez nombreux pour que chaque bactérie réceptive puisse en rencontrer un ; mais, de plus, les bactéries réceptives sont toujours très nombreuses au départ

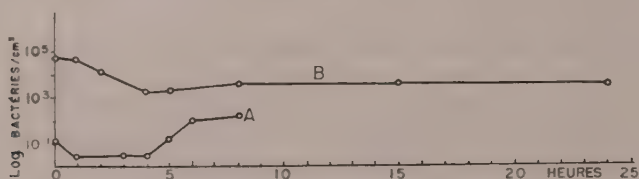


FIG. 3. — Effet inhibiteur du troisième type (deux concentrations différentes de bactéries de la même souche) ; la courbe B montre après la lyse primaire une phase stationnaire prolongée.

Voir nota figure 1.

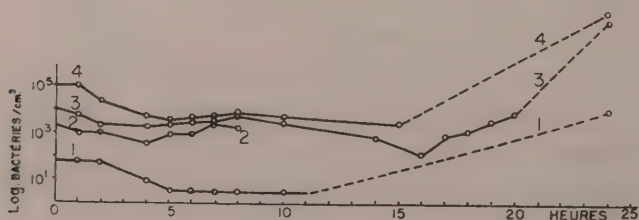


FIG. 4. — Effet inhibiteur du troisième type (quatre concentrations différentes de bactéries de la même souche) : lyse primaire, phase stationnaire, culture secondaire semi-résistante à croissance irrégulière, et finalement apparition de bactéries résistantes à croissance logarithmique.

Voir nota figure 1.

(alors qu'elles ne l'étaient pas toujours dans le type précédent). et surtout l'action du phage sur la culture secondaire est plus intense que dans le type précédent.

4° EFFET INHIBITEUR DU 4° TYPE. — Il consiste dans la *stérilisation* de la culture, précédée ou non d'une courte phase de croissance. Fait remarquable, la stérilisation ne peut se faire qu'au moment de la lyse primaire ; autrement dit, elle n'est possible que si aucun mutant réfractaire viable n'existe à ce moment. Nous savons qu'un mutant réfractaire (2) peut donner un clone

(2) Dans le cas où il appartient au type semi-résistant [6, 9].

contenant des bactéries réceptives ; mais ceci montre qu'un tel clone contient toujours aussi des bactéries réfractaires.

2° EFFET INHIBITEUR DES PHAGES NON UTILISÉS EN EXCÈS.

Les types évolutifs sont les mêmes dans l'ensemble qu'avec les phages utilisés en excès ; mais il y a des différences découlant du fait que, les bactéries réceptives présentes au départ n'étant pas toutes lysées d'emblée, la multiplication des bactéries réceptives qui se produit entre l'introduction du phage et l'achèvement de la lyse des dernières bactéries réceptives peut produire des mutants réfractaires. Si de tels mutants existaient déjà dans la population au moment de l'introduction du phage, ces nouveaux mutants en augmentent le nombre. Si aucun mutant réfractaire n'existait au début, la population qui aurait été stérilisée par le phage en excès ne l'est plus par le phage en moindre quantité. Le nombre de mutants réfractaires produits entre l'introduction du phage et l'achèvement de la lyse dépend du rapport des concentrations $\frac{\text{phages}}{\text{bactéries}}$ au départ et du taux de mutation des bactéries réceptives en bactéries réfractaires.

Les intensités des diverses actions du phage vont généralement de pair, les plus grands effets lytiques primaires allant avec les retards, les prolongations et les limitations de croissance les plus intenses. En particulier, quand l'effet inhibiteur est du 3^e degré, la longueur de la phase stationnaire dépend en partie de l'intensité de la lyse primaire. Mais il y a quelques exceptions dont l'interprétation est plus difficile. Nous y reviendrons.

On pourrait évaluer plus exactement l'action lytique primaire en calculant le pourcentage des bactéries lysées. Mais il est impossible d'en faire autant pour les actions du phage sur la croissance secondaire. En effet, ces actions dépendent non seulement du nombre des bactéries atteintes, mais aussi du moment où les lyses secondaires et les bactériostases se produisent, et de la durée des bactériostases. Or, aucune précision n'est possible sur ce sujet. L'effet inhibiteur du phage ne peut donc être évalué que globalement d'après les caractères de la lyse primaire et de l'ensemble des modifications de la courbe de croissance.

Causes d'erreurs.

Rappelons que dans certains lysats existent des facteurs qui peuvent interférer avec l'action du phage, les uns agissent dans le même sens que lui (facteur bactériostatique ou bactériolytique du lysat) [10] ; les autres en sens contraire (facteur antagoniste du phage). Nous discuterons ces causes d'erreurs dans une prochaine publication.

III. — EFFET INHIBITEUR D'UN PHAGE EN FONCTION DES DIFFÉRENTS FACTEURS DONT IL DÉPEND.

Cette étude est réalisable grâce à la possibilité d'évaluer l'effet inhibiteur à l'aide des éléments indiqués plus haut. Il faut considérer séparément le rôle des facteurs qui sont pratiquement constants et celui des facteurs qui varient au cours de l'évolution de la culture.

1° FACTEURS PRATIQUEMENT CONSTANTS AU COURS DE L'ÉVOLUTION DE LA CULTURE. — *La composition du milieu* (par exemple au point de vue de l'équilibre P/Ca [8]) *et le pH* ne sont pas absolument constants, mais leurs variations sont négligeables au point de vue de l'action des phages. La *température*, le *degré d'oxygénation*, sont maintenus constants sans difficulté. L'effet inhibiteur d'un phage est évidemment d'autant plus grand que ces facteurs sont plus favorables à l'action des phages dans les conditions considérées.

2° FACTEURS VARIANT AU COURS DE L'ÉVOLUTION DE LA CULTURE. — Ce sont :

- la concentration des phages ;
- la proportion des phages actifs (parfois) ;
- la concentration des bactéries ;
- la proportion des bactéries réceptives.

Leurs variations ne sont d'ailleurs pas indépendantes les unes des autres. Par exemple, les lyses diminuent la concentration des bactéries et la proportion des bactéries réceptives, en même temps qu'elles augmentent la concentration des phages ; la multiplication des bactéries change la proportion des bactéries réceptives, en même temps que la concentration totale des bactéries. Ainsi l'action des phages sur une culture en croissance s'opère dans des conditions toujours nouvelles et on peut se demander s'il est possible de déterminer le rôle de ces facteurs dont on ne connaît que la *valeur initiale*. Mais l'expérience montre que :

a) *Chaque race de phages* est caractérisée non seulement par sa proportion de phages actifs vis-à-vis d'une souche déterminée, mais aussi par la loi particulière suivant laquelle des changements se produisent dans cette proportion au cours de la multiplication de ce phage sur cette souche.

b) *Chaque souche de bactéries* est caractérisée non seulement par sa proportion de bactéries réceptives à un phage déterminé, mais aussi par son potentiel génétique de mutation des bactéries sensibles en bactéries résistantes ou semi-résistantes et par la fréquence d'apparition de l'état réceptif à ce phage chez les bactéries semi-résistantes (3).

(3) Nous avons montré dans un travail antérieur l'existence de ces passages d'un état réfractaire à un état réceptif, qui sont d'ordre phénotypique [6, 9] et sur lesquels nous reviendrons à la discussion.

Ces mutations et ces transformations se font suivant une loi propre à cette souche.

Considérons maintenant une série de systèmes, identiques par ailleurs, où entrent des phages de même race et des bactéries de même souche, mais qui diffèrent par les concentrations initiales de l'un de ces éléments ou des deux. Dans tous ces systèmes, d'après ce qui précède, l'évolution est *entièrement déterminée par ces valeurs initiales* ; elle varie donc suivant une certaine loi en fonction des valeurs initiales des concentrations de phages et de bactéries. Cette loi est caractéristique de l'interaction du phage et de la souche considérés. De même l'effet sur la même souche de chaque phage différent varie suivant une certaine loi en fonction des concentrations initiales des phages et des bactéries. Cette loi est caractéristique de l'action du phage sur la souche.

IV. — PRÉCISIONS SUR LA NOTION D'EFFICACITÉ.

Nous avons vu que l'efficacité d'un phage sur une souche est, parmi les facteurs qui conditionnent l'inhibition des cultures de la souche par le phage, celui qui est propre à la race de phage considérée. Déterminer une efficacité de façon précise reviendrait donc à trouver la loi caractéristique de l'action du phage sur la souche, dans des conditions convenablement standardisées.

Pour trouver cette loi il faudrait théoriquement faire l'étude complète des variations de l'évolution des cultures de la souche en présence des phages, en fonction des concentrations initiales respectives de phages et de bactéries. A tout système de valeurs de ces deux variables correspondrait une courbe évolutive déterminée. Si l'une des variables était maintenue constante, à chaque valeur initiale de l'autre variable correspondrait une courbe différente et les variations de l'évolution en fonction des variations de l'une des variables serait représentée par une famille de courbes. Pour représenter toutes les variations de l'évolution de la culture en fonction des variations des deux variables, il faudrait une infinité de familles de courbes.

La détermination précise de l'efficacité dans ces conditions serait impossible ; mais, en fait, *il suffit de tracer un certain nombre de courbes correspondant à diverses concentrations initiales convenablement choisies des phages et des bactéries et dans des conditions standardisées* pour la déterminer avec une approximation suffisante. C'est ce que nous verrons dans une prochaine publication :

L'expérience vérifie d'ailleurs bien que l'effet inhibiteur du phage dans un seul système de concentrations de phages et de bactéries ne renseigne pas sur l'efficacité. On peut en donner les exemples suivants :

a) Il arrive que deux phages, employés à la même concentration, stéri-

lisent respectivement la même concentration de bactéries tout en ayant des effets d'intensité différente sur des concentrations plus fortes de bactéries ;

b) Il arrive aussi que deux phages, ayant des effets très faibles et égaux sur une forte concentration de bactéries, aient des effets plus forts, mais inégaux sur des concentrations plus faibles ;

c) Enfin, deux phages, tous deux à la même concentration, peuvent avoir des effets égaux sur une certaine concentration de bactéries, quand ils sont employés à forte concentration et des effets inégaux sur la même concentration de bactéries, quand ils sont employés à une concentration plus faible.

V. — DISCUSSION.

1° L'évaluation de l'effet inhibiteur des phages sur une culture a été basée sur les modifications que l'infection par le phage imprime à l'évolution de cette culture (voir [11]). Cet effet est donc d'autant plus marqué que la courbe s'éloigne plus de l'exponentielle normale.

2° Pour expliquer les actions des phages sur les cultures secondaires on peut envisager deux hypothèses : ou bien les bactéries survivantes sont devenues lysogènes, c'est-à-dire que leurs descendants contiennent un prophage qui, chez certains, se transforme en phage ; ou bien elles sont semi-résistantes, c'est-à-dire qu'une partie de leurs descendants sont susceptibles de devenir réceptifs à l'infection par le phage. Dans les cas que nous avons étudiés au moins, il faut retenir la seconde hypothèse, car : a) ces subcultures donnent sur gélose un nombre beaucoup plus grand de colonies en présence de sérum antiphage spécifique qu'en l'absence de celui-ci (Wahl et Terrade [41]) ; b) on a pu facilement, en quelques isolements de colonies en présence de sérum antiphage, débarrasser ces bactéries des phages ; elles reprennent alors leur capacité de croissance normale et on obtient ainsi une souche ayant les caractères de la semi-résistance ; c) la présence de mutants semi-résistants peut être démontrée dans des cultures de souches non infectées par les phages.

L'évolution de la culture est, si l'on accepte cette seconde hypothèse, la résultante de deux phénomènes antagonistes : la croissance de la population et l'action destructrice des phages sur les bactéries infectées. Cette dernière résulte évidemment de toutes les actions exercées individuellement par les phages sur les bactéries pendant la lyse primaire, puis pendant toute la croissance de la culture secondaire. Ces actions sont à considérer du point de vue quantitatif et qualitatif.

3° Les actions individuelles des phages, du point de vue quantitatif. — Le nombre des bactéries infectées par les phages est égal au nombre de rencontres efficaces entre bactéries et phages. Si une partie des rencontres est inefficace, c'est qu'à chaque

instant une partie des phages est inactive ou une partie des bactéries est réfractaire. Dans le premier cas il s'agit, par exemple, de phages dont la vie active est très courte. Dans le second, nous avons montré que le comportement des bactéries vis-à-vis des phages est conditionné par certains de leurs caractères génotypiques ou phénotypiques. Il existe, à ce point de vue, trois génotypes : le type sensible, qui est toujours réceptif, le type résistant, qui est toujours réfractaire, le type semi-résistant avec deux phénotypes, l'un réceptif, l'autre réfractaire [8].

Il y a donc des souches sensibles et des souches semi-résistantes [6]. De plus, les deux types donnent des mutants qui sont l'origine de clones dont la réactivité est inférieure à celle de la souche originelle [4] : les souches sensibles donnent des mutants semi-résistants ou résistants ; les souches semi-résistantes donnent, soit des mutants semi-résistants qui sont à l'origine de clones de réactivité inférieure à celle de la souche, soit des mutants résistants, soit à la fois des mutants des deux types.

Une population, qu'elle soit sensible ou semi-résistante dans l'ensemble, contient donc au départ des bactéries réceptives et des bactéries réfractaires (résistantes ou semi-résistantes). L'effet inhibiteur du phage dépend d'une part du nombre des bactéries réceptives présentes au départ, d'autre part du nombre des bactéries semi-résistantes réceptives qui apparaissent dans la descendance des bactéries semi-résistantes réfractaires.

L'effet inhibiteur que nous avons décrit plus haut comme caractérisant le premier type, s'observe soit quand les phages actifs sur la souche sont peu nombreux, soit quand la réactivité de la souche est faible (dans le second cas, ses bactéries sont semi-résistantes). Dans les deuxième et troisième types, les phages sont tous actifs et la grande majorité des bactéries est réceptive ; autrement dit, il s'agit de souches d'assez forte réactivité. Si toutes les bactéries réfractaires sont semi-résistantes, elles donnent une culture secondaire qui subit les actions du phage, en particulier ces actions limitent généralement la croissance de cette culture secondaire. Cependant, parfois des mutants résistants apparaissent tardivement dans la culture secondaire semi-résistante et la croissance reprend, cette fois avec le type exponentiel (fig. 4). Si une partie ou la totalité des bactéries réfractaires est résistante, la croissance secondaire suit d'emblée une exponentielle (fig. 1).

Rappelons enfin que, dans quelques cas, une partie des bactéries réfractaires de la souche peut être lysée secondairement par des mutants du phage, actifs sur eux.

(4) La réactivité d'une population est fonction de la proportion de bactéries réceptives qu'elle produit.

4° *Les actions individuelles des phages du point de vue qualitatif.* — Les phages agissent, en principe, sur les bactéries réceptives (sensibles ou semi-résistantes en état réceptif). Cette action est létale et lytique. Elle rend bien compte des actions lytiques primaires et secondaires. Mais l'explication des périodes stationnaires intéressant les bactéries survivantes ou leur descendance est plus difficile à donner. On peut se demander si le phage n'exerce pas une action bactériostatique sur les bactéries survivantes semi-résistantes, quand elles sont en état réfractaire. Notons que ces périodes stationnaires manquent dans certains des cas où il existe des bactéries semi-résistantes réfractaires, probablement parce qu'il y a aussi dans la population des bactéries résistantes sur lesquelles le phage n'a pas d'action bactériostatique.

Il n'est cependant pas impossible que les périodes stationnaires s'expliquent par des lyses partielles et des multiplications de bactéries se compensant mutuellement.

Si cette bactériostase est réelle, on peut se demander si elle est bien due au phage lui-même et non à un facteur bactériostatique du lysat. Il y a des raisons de croire à une action directe du phage, comme l'ont montré Wahl et Terrade [41].

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° L'effet inhibiteur d'un phage sur une culture est la somme de son action lytique initiale et des actions qu'il exerce sur la culture secondaire pendant toute sa croissance. L'efficacité d'un phage sur une souche est, parmi les facteurs qui conditionnent son effet inhibiteur sur les cultures de la souche, celui qui caractérise la race du phage.

2° L'effet inhibiteur peut avoir tous les degrés entre une légère modification de la courbe de croissance et la stérilisation de la culture. Suivant l'intensité de cet effet on peut en décrire quatre types différents.

3° L'effet inhibiteur est fonction de différents facteurs, les uns (tels que la composition du milieu, la température) restent pratiquement constants ; les autres (les concentrations respectives des phages et des bactéries) varient au cours de l'évolution de la culture. Mais ces variations sont entièrement déterminées par la valeur initiale de ces concentrations.

4° L'efficacité d'un phage sur une souche est donc indiquée par la loi des variations de l'évolution des cultures de la souche infectées par ce phage en fonction des concentrations initiales des phages et des bactéries.

5° Les actions secondaires des phages paraissent s'exercer sur des bactéries semi-résistantes (en état réceptif). On n'a pas cons-

tat  d'apparition de bactéries lysogènes dans les cultures infect es par les phages qui ont été  tudi es dans ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. J. DUBOS, J. H. STRAUS et C. PRICE. *J. exp. Med.*, 1943, **78**, 161.
- [2] H. E. MORTON et J. PEREZ-OTERO. *J. Bact.*, 1944, **47**, 175.
- [3] H. E. MORTON et J. PEREZ-OTERO. *J. Bact.*, 1945, **49**, 437.
- [4] A. TERRADE. *Thèse Pharmacie*, Bordeaux, 1950.
- [5] R. WAHL. *Ces Annales*, 1952, **83**, 464.
- [6] R. WAHL. *Ces Annales*, 1953, **84**, 51.
- [7] R. WAHL et L. BLUM- MERIQUE. *Ces Annales*, 1949, **77**, 137.
- [8] R. WAHL et L. BLUM- MERIQUE. *Ces Annales*, 1951, **80**, 155.
- [9] R. WAHL et L. BLUM- MERIQUE. *Ces Annales*, 1952, **82**, 266.
- [10] R. WAHL et J. JOSSE-GOICHOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 1225 et 1703.
- [11] R. WAHL et A. TERRADE. *Ces Annales*, 1950, **79**, 255.
- [12] R. WAHL et A. TERRADE. *Ces Annales*, 1950, **79**, 878.

**SUR LA DÉTERMINATION DES *CANDIDA*.
ÉTUDE DES CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES
ET PHYSIOLOGIQUES
DE 78 SOUCHES ISOLÉES
DE PRÉLÈVEMENTS PATHOLOGIQUES**

par E. DROUHET et M^{lle} M. COUTEAU (*)

(Institut Pasteur,
Service de Mycologie et de Physiologie végétale.)

Les *Candida*, anciennement appelés *Monilia*, sont des champignons anascosporés, produisant un pseudo ou un vrai mycélium et portant des verticilles réguliers de blastospores ; la plupart sont des saprophytes habituels de la peau et des muqueuses.

Certaines espèces de *Candida* comme *C. albicans* peuvent devenir pathogènes chez des enfants débiles, des vieillards, des cachectiques et surtout, comme on l'a constaté depuis peu, chez des sujets traités intensément par des antibiotiques, en particulier auréomycine, chloramphénicol ou terramycine [8, 26].

Une identification rapide et simple est nécessaire pour différencier les espèces pathogènes de celles habituellement saprophytes. C'est à Langeron [9] que revient le mérite d'avoir mis de l'ordre dans la confusion qui régnait en mycologie médicale à ce sujet ; partant des travaux de Stelling-Dekker et de Lodder, il a établi les méthodes de classification des *Candida*. Ces méthodes sont basées sur : 1° les caractères morphologiques : aspect macroscopique sur milieu gélosé et liquide (présence de voile ou d'anneau) ; aspect microscopique (filamentation, chlamydo-spores) ; 2° les caractères de fermentation des sucres ; 3° l'assimilation des sucres et des substances azotées. A ces critères on peut ajouter l'étude du pouvoir pathogène pour les animaux de laboratoire.

Au cours des analyses de laboratoire couramment demandées pour l'identification des levures, nous avons été amenés depuis deux ans, à modifier certaines techniques habituelles. Différents procédés ont été confrontés ; nous rapportons dans ce travail les

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 février 1954.

résultats de la détermination des caractères morphologiques et physiologiques de 78 souches de *Candida* d'origine humaine provenant de prélèvements pathologiques envoyés par divers services hospitaliers ou laboratoires.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Isolément. — Le produit pathologique (crachats, selles, liquides pathologiques) est ensemencé sur le milieu de Sabouraud modifié par Langeron (glucose 2 p. 100, peptone Chapoteaut 1 p. 100, gélose 1,8 p. 100) et mis à 37°. A ce milieu coulé en boîte de Petri ou en tubes, on ajoute, au moment de l'emploi, de la pénicilline (20 U.O./cm³) et de la streptomycine (40 µg/cm³) ; afin d'éviter la contamination bactérienne des souches. L'ensemencement se fait par l'étalement du produit à étudier sur la surface de la gélose ; cela permet, par le nombre de colonies apparues, d'évaluer approximativement la richesse en levures. Si des contaminations surviennent, les levures sont débarrassées par passage sur un milieu contenant un autre antibiotique, ou en faisant une ou deux cultures successives de quarante-huit heures dans le liquide de Raulin, milieu qui par son acidité empêche les bactéries de se développer.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES DES CULTURES. — Après l'isolement à 37° sur le milieu gélosé glucosé de Sabouraud, on fait des repiquages sur milieu liquide et milieux solides.

1° *Milieu liquide*. — La recherche de la formation de voile, d'anneau ou de dépôt, est faite en milieu liquide glucosé à 2 p. 100 et peptoné à 1 p. 100. La lecture est effectuée après trois jours et dix jours de séjour à 25°.

2° *Milieux solides*. — Les deux milieux gélosés de routine sont la gélose glucosée de Sabouraud modifiée par Langeron et la gélose pomme de terre-carotte (milieu PC : pulpe de pomme de terre : 20 g ; pulpe de carotte : 20 g ; eau distillée : 1 000 cm³. Après macération, faire bouillir, ajouter 20 g de gélose, stériliser à 115°). Différentes souches de *Candida* ont été étudiées sur des milieux spéciaux comme : « corn-meal » agar (farine de maïs jaune, préparée suivant la technique de Benham [2]), maïs maltosé suivant la technique de Langeron, tyrosine-glucose suivant la technique de Langeron et Luteraan [11], et moût de bière. L'ensemencement sur gélose inclinée en tubes de 17/170 mm se fait en deux points séparés et une strie terminale dans la partie haute du tube ; les deux points permettent d'observer les principaux caractères macroscopiques des cultures (couleur, aspect, consistance, état de la surface) et la strie, la filamentation à travers la paroi du tube ; cette strie doit être tracée légèrement en profondeur, ce qui favorise la filamentation et l'apparition des chlamydospores ; incubation à 25°. Pour l'examen microscopique, on peut découper légèrement, en profondeur, un fragment de colonie que l'on écrase simplement entre lame et lamelle ; on peut, à la rigueur, utiliser 1 goutte de bleu coton au lactophénol, mais à notre avis sans avantage.

Cependant, pour une observation plus précise de la morphologie

microscopique, on aura recours aux cultures sur lames gélosées de Rivalier et Seydel [49] qui restent le procédé de choix pour l'étude de l'appareil sporifère des *Candida*. L'ensemencement se fait par deux stries parallèles rayant légèrement la mince couche du milieu gélosé (milieu PC gélosé à 0,6 p. 100). Après dessiccation à l'étuve et fixation à l'alcool absolu, on utilise comme coloration de routine soit : 1° le bleu coton acétique, cinq minutes ; différenciation à l'alcool absolu ; toluène ; baume ; soit 2° une des colorations acides doubles préconisées par Langeron et Luteraan [10] pour différencier ascospores et chlamydospores des autres éléments fongiques : érythrosine 1 p. 100, phéniquée 5 p. 100, quinze minutes ; bleu trypan 1 p. 100, phéniqué 5 p. 100, cinq minutes ; lavage aux alcools 50°, 70°, 90° et absolu ; toluène et baume.

Procédés d'identification de C. albicans en atmosphère enrichie en CO₂ et à 37°. — Tenant compte de l'observation de Langeron [9] sur l'action favorable du CO₂ sur la filamentation des *Candida*, Weld [23] préconise le procédé suivant : le milieu de Levine éosine-bleu de méthylène (Bacto-peptone « Difco » : 10 g ; lactose : 10 g ; phosphate monopotassique : 2 g ; gélose : 15 g ; éosine jaunâtre : 0,4 g ; bleu de méthylène : 0,065 g) additionné de 0,1 mg d'auroomycine par centimètre cube, est coulé en boîte de Petri et ensemencé avec le produit pathologique à étudier ou une suspension de levures ; incubation à 37° en atmosphère enrichie en CO₂. Une atmosphère de 10 à 20 p. 100 de CO₂ est obtenue dans les conditions suivantes : on place le matériel à étudier dans un dessiccateur à vide d'une capacité de 4 l, contenant 2 g de bicarbonate et 14 cm³ d'acide sulfurique à 5 p. 100 ; on ouvre le robinet pour réduire la surpression formée par le dégagement du CO₂, puis on ferme rapidement. Dans un délai maximum de quarante-huit heures, *C. albicans* donne des colonies filamenteuses, tandis que les autres espèces de *Candida* donnent uniquement des colonies levuriformes ; les colonies de *C. albicans* transplantées sur gélose de Sabouraud et ensuite sur PC à 25° et en atmosphère normale, montrent après quatre jours de culture des filaments mycéliens avec des chlamydospores caractéristiques.

Procédé simplifié. — Nous avons supprimé du milieu décrit les colorants et le lactose, sucre non assimilé par *C. albicans* et obtenu des résultats comparables ; nous procédons selon la technique suivante :

Après isolement sur la gélose de Sabouraud, on ensemence sur le milieu peptoné suivant : « Bacto-peptone » : 10 g ; phosphate monopotassique : 2 g ; gélose : 15 g ; eau bi-distillée : 1 000 cm³. Ce milieu (en boîtes de Petri ou en tubes de 17/170 mm) est incubé à 37° dans un récipient contenant 10 à 20 p. 100 de CO₂. Après quarante-huit heures, on procède à l'examen des colonies et au repiquage de celles-ci sur milieu PC gélosé à 25° et en atmosphère normale. Ce repiquage permet d'obtenir en trois à quatre jours des chlamydospores caractéristiques de *C. albicans* (Pl. I, fig. 2, 3, 4).

CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES. — 1° *Fermentation des sucres.* — Les méthodes classiques en zymologie médicale sont la méthode de la cloche renversée dans un tube à essai, qui ne peut donner une mesure exacte ni suffisante d'un faible pouvoir fermentaire, et la méthode des

tubes à tampon de paraffine (méthode de Guerra utilisée par Langeron et Guerra [9]). Cette dernière méthode est très fidèle mais comporte de délicates manipulations. Nous avons adopté la technique suivante, couramment employée en bactériologie, et qui nous paraît très fidèle et plus simple : on utilise des tubes d'Yvan Hall, tubes de 17/170 mm présentant un étranglement à leur tiers inférieur dans lequel vient se loger une bille de verre qui fait soupape. Le milieu de base est l'eau peptonée à 1 p. 100, ajustée à pH 7,2-7,4, à laquelle on ajoute 1 p. 100 de l'indicateur d'Andrade (solution à 0,5 p. 100 de fuchsine décolorée par NaOH). Le milieu est jaune paille à pH 7,2-7,4, vire au rouge cerise plus ou moins intense suivant l'acidification. La répartition du liquide dans les tubes est d'environ 9 cm³, ce qui correspond au niveau supérieur de l'étranglement. Après stérilisation, on ajoute dans chaque tube 1 cm³ d'une solution stérile à 20 p. 100 d'un sucre ; les sucres à tester sont les suivants : glucose, saccharose, maltose, lactose et raffinose. Après évacuation de l'air par une ébullition de dix minutes, les tubes refroidis peuvent être ensemencés ; l'ensemencement se fait facilement en chassant la bille de l'étranglement et en émulsionnant, dans le milieu, une anse de culture de vingt-quatre heures sur gélose glucose de Sabouraud. Afin d'obtenir des résultats uniformes, l'incubation doit être faite à température constante (25° environ). Après quarante-huit heures de culture, on agite légèrement les tubes pour éviter le blocage des gaz le long des parois. La lecture des fermentations est faite après dix jours, mais les résultats définitifs sont donnés après vingt jours, certaines souches produisant des fermentations tardives.

2° *Assimilation des sucres.* — Le milieu synthétique employé par Lodder en 1934 [12] (sulfate d'ammonium : 0,5 g ; phosphate monopotassique : 0,1 g ; sulfate de magnésium : 0,05 g ; gélose lavée : 2 g ; eau distillée : 100 cm³) avait été modifié par Langeron [9] qui supprimait le sulfate d'ammonium et le lavage de la gélose, les impuretés de celle-ci servaient comme source d'azote. Sur ce milieu coulé en boîtes de Petri et ensemencé avec l'émulsion de la levure à étudier, les auteurs déposent en des points différents, des cristaux des sucres à étudier.

Tenant compte du besoin en vitamines des diverses souches de *Candida* cultivées en milieu synthétique [4, 18, 20] nous utilisons le milieu suivant : gélose lavée : 20 g ; sulfate d'ammonium : 2 g ; phosphate monopotassique : 1,5 g ; sulfate de magnésium : 0,25 g ; biotine : 10⁻⁹ ; thiamine : 10⁻⁶ ; acide nicotinique : 10⁻⁶ [27] ; oligo-éléments (solution de Berthelot) : X gouttes ; eau bidistillée : 1 000 cm³.

Le milieu fondu au bain-marie et refroidi à 50° est additionné de 1 cm³ d'une suspension de levures lavées trois fois (2 anses d'une culture de vingt-quatre heures par centimètre cube d'eau physiologique). Après avoir agité pour obtenir un mélange homogène, le milieu est coulé en boîtes de Petri de 15 cm. Après solidification de la gélose, au lieu de déposer les sucres en cristaux par petits tas, comme dans les techniques précédentes, on dépose des *disques de papier* imprégnés de II gouttes d'une des solutions à 20 p. 100 des sucres suivants : glucose, saccharose, maltose, lactose et raffinose ; les différentes couleurs des disques de papier distinguent les sucres. On retourne les

boîtes pour éviter que l'eau de condensation ne retombe à la surface du milieu. On observe après vingt-quatre à quarante-huit heures une croissance intense autour des sucres assimilés. Le diamètre des cultures dans la zone d'assimilation est d'environ 3 à 4 cm.

3° *Assimilation de l'azote*. — Langeron [9] utilisait la technique de Lodder précédemment décrite pour l'assimilation des sucres, mais la gélose était lavée pour éliminer un apport d'azote par les impuretés, la source de carbone étant du glucose pur. Nous utilisons un milieu semblable, mais enrichi en vitamines : gélose lavée : 20 g ; glucose pur : 20 g ; solution d'oligoéléments de Berthelot : X gouttes ; phosphate monopotassique : 1,5 g ; sulfate de magnésium : 0,25 g ; biotine : 10^{-9} ; thiamine : 10^{-6} ; acide nicotinique : 10^{-6} [27] ; eau bidistillée : 1 000 cm³. Les disques de papier sont alors imprégnés de II gouttes d'une des solutions des substances suivantes : peptone, asparagine, sulfate d'ammonium, nitrate de potassium (solutions à 20 p. 100) ; urée (solution à 10 p. 100). Les résultats sont lus après vingt-quatre à quarante-huit heures.

4° *Besoins en vitamines*. — L'étude des besoins en vitamines a été faite avec les milieux de base suivants : glucose traité par le charbon activé : 20 g ; asparagine synthétique : 1 g ou hydrolysate de caséine : 10 g ; gélose lavée : 20 g ; solution de Berthelot : X gouttes ; phosphate monopotassique : 1,5 ; sulfate de magnésium : 0,25 g ; eau distillée dans le Pyrex : 1 000 cm³. Ces milieux constituent les milieux « minimum ». Les milieux « maximum » sont ces milieux de base additionnés des différentes vitamines suivantes : biotine : 10^{-9} ; thiamine : 10^{-6} ; acide nicotinique : 10^{-6} ; inositol : 10^{-5} ; pyridoxine : 10^{-6} ; pantothénate de calcium : 10^{-6} ; les autres milieux sont des milieux « minimum » auxquels sont ajoutées toutes les vitamines, moins celles dont on désire étudier l'action.

5° *Pouvoir pathogène chez l'animal*. — Le lapin a été utilisé comme animal de choix pour la détermination des *Candida* à cause de la sensibilité de cet animal à *C. albicans*. Le lapin a été inoculé par voie intraveineuse avec 2 cm³ d'une suspension de levures contenant environ 500 millions d'éléments (4 anses d'une culture de quarante-huit heures sur milieu de Sabouraud, émulsionnées dans 2 cm³ d'eau physiologique). Les coupes des organes ont été colorées par la technique de Dominici (érythrosine-bleu de toluidine) ou par la technique de Hotchkiss à l'acide periodique [6]. Les filaments et les levures sont colorés en bleu par la première technique, en rouge violacé par la seconde.

RÉSULTATS.

Les différentes techniques mentionnées ci-dessus nous ont permis d'étudier les caractères des souches de *Candida* isolées des produits pathologiques qui parvenaient au laboratoire et comparativement les caractères des souches suivantes de collection : *C. albicans* IP 50, IP 49, IP 200 ; *C. tropicalis* IP 43, IP 201, IP 203 ; *C. pseudotropicalis* IP 42 ; *C. krusei* IP 46, IP 207, IP 208 ; *C. parakrusei* IP 45, IP 205 ; *C. guilliermondi*

IP 47; *C. zeylanoides* IP 41. Il nous a été ainsi possible de vérifier la fidélité des tests employés.

Le tableau I résume l'origine des souches déterminées et le tableau II les caractères généraux que nous avons trouvés pour ces souches.

TABLEAU I. — Origine et manifestations pathologiques de 78 souches de *Candida*.

Souches isolées	Nombre de souches	Origine des prélèvements								Manifestations pathologiques évidentes
		crachats	tubage gastrique	bouche amygdalée	vagin	urine	selles	abcès	Peau et muqueuses	
<i>C.albicans</i>	45	29	5	4	2	3	0	2	0	1 abcès rénal 1 " cutané 2 monilioses généralisées mortelles
<i>C.tropicalis</i>	10	5	0	3	0	2	0	0	0	1 moniliose pulmonaire 2 langues noires
<i>C.pseudotropicalis</i>	8	5	1	2	0	0	0	0	0	
<i>C.krusei</i>	6	2	0	0	0	2	0	1	1	1 dermatite
<i>C.parakrusei</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 abcès cutané
<i>C.guilliermondii</i>	3	2	0	0	0	0	0	0	1	
<i>C.pelliculosa</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0	

TABLEAU II. — Caractères généraux des espèces de *Candida* étudiées.

Souches étudiées	Caractères morphologiques			Caractères physiologiques															Pouvoir pathogène pour le lapin: mortalité ***
	chlamydozoïes	anneau	voile	Zymogramme					Auxanogramme de C					Auxanogramme de N					
				Glucose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose	Glucose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose	Peptone	Asparagine	Urée	SC ₄ (NH ₄) ₂	NO ₃ K	
<u>C.albicans</u>	+	-	+	AG	A	AG	O	O	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	100%
<u>C.tropicalis</u>	-	+	++	AG	AG	AG	O	O	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	50%
<u>C.pelliculosa</u>	-	-	+	AG	AG	AG	O	AG	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
<u>C.pseudotropicalis</u>	-	+	-	AG	AG	O	AG	AG	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	nulle
<u>C.guilliermondi</u>	-	+	+	AG	AG	O	O	AG	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	nulle
<u>C.krusei</u>	-	+	+	AG	O	O	O	O	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	nulle
<u>C.parakrusei</u>	-	+	+	AG	O	O	O	O	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	nulle
<u>C.zeylanoides</u>	-	+	-	O	O	O	O	O	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	nulle

* nous n'avons pas rencontré la variété *triadis* qui forme un voile;

** une seule souche n'a pas produit de voile

*** chiffre exprimant le pourcentage des souches provoquant la mort du lapin.

Parmi ces dernières souches, 21 sur 27 provenaient de sujets ayant subi un traitement intense aux antibiotiques; les manifestations pathologiques évidentes mentionnées au tableau I sont survenues principalement chez des sujets traités par de fortes doses d'antibiotiques. Ceci confirme les nombreuses autres observations sur ce sujet [8, 26].

Critique des caractères des souches isolées.

1° *Caractères morphologiques.* — Les caractères macroscopiques des colonies sur les milieux gélosés ne permettent pas de différencier les diverses espèces de *Candida*; ils permettent seulement de distinguer les *Candida* à colonies crémeuses et blanchâtres, des *Cryptococcus* (*Torulopsis*) à colonies pigmentées (ocre) et muqueuses et de certaines levures à pigment noir ou rouge. La plupart des colonies de *Candida* sont crémeuses, certaines sont plissées, d'autres mates.

La formation d'un dépôt au fond du tube, d'anneau ou de voile à la surface du milieu liquide est fréquemment utilisée comme critère de classification des levures. Les résultats obtenus avec les souches de *Candida* en milieu liquide glucosé de Sabouraud sont les suivants :

1° Aucune des souches de *C. albicans* ne produit de voile; toutes produisent seulement un dépôt. Langeron a distingué une espèce particulière, *C. triadis*, qui ne diffère de *C. albicans* que par la formation d'un voile et d'un pigment jaunâtre. Nous n'avons pas rencontré cette souche, qui d'ailleurs est considérée comme une variété rare de *C. albicans*. 2° Toutes les souches de *C. krusei* produisent un voile muqueux. 3° La souche de *C. parakrusei* isolée ne produit pas de voile et ceci est en accord avec les descriptions classiques. 4° Toutes les souches de *C. tropicalis*, à l'exception d'une seule produisent un voile aéré. 5° Trois souches de *C. guillermonti* ne forment pas de voile; une seule souche de cette espèce a formé un voile, s'identifiant ainsi à la variété *membranacei*, récemment décrite par Lodder et Kreger Van Rij [43].

La formation ou l'absence de voile ne semble être qu'un caractère secondaire dans la détermination des espèces de *Candida*. Elle est utile seulement comme critère d'orientation à côté des caractères de fermentation et d'assimilation des sucres. Ainsi une levure qui fait fermenter le glucose peut être *C. krusei* ou *C. parakrusei*. La présence de voile oriente le diagnostic vers *C. krusei* et la confirmation peut être donnée par l'assimilation des sucres: *C. krusei* assimile seulement le glucose, tandis que *C. parakrusei* assimile en plus le saccharose et le maltose.

La morphologie microscopique de *Candida* permet une détermination précise seulement dans le cas de l'observation des chlamydospores, grosses cellules rondes dont la paroi est très épaisse. Leur apparition permet d'affirmer avec certitude le diagnostic de l'espèce *C. albicans* comme l'a montré Langeron. Toutefois, récemment Morquer et coll. [47] ont isolé d'une blastomycose du chien, une nouvelle espèce de *Candida* qu'ils nomment *C. pseudo-*

tumoralis, qui produit comme *C. albicans* des chlamydospores, mais qui diffère par les caractères fermentaires (glucose, saccharose, maltose et galactose fermentés) et l'assimilation des sucres. En ce qui concerne les autres espèces de *Candida*, la morphologie microscopique est de peu d'utilité pratique à cause de son extrême variabilité.

Nous signalons l'aspect particulier des chlamydospores de *C. albicans* à l'examen au microscope à contraste de phase. Les chlamydospores attirent l'attention par leur aspect brillant, contrastant avec l'aspect sombre des blastospores, des filaments et du fond de la préparation (pl. I, fig. 2, 4) ; l'examen en contraste de phase présente une utilité incontestable pour la recherche pratique des chlamydospores.

De tous les milieux étudiés (« corn-meal agar », maïs maltosé, amidon soluble peptoné, tyrosine-glucose), le milieu pomme de terre-carotte à la température de 25° nous a paru favoriser le plus la filamentation de toutes les espèces de *Candida* et l'apparition des chlamydospores de *C. albicans*. Mais la formation de ces éléments n'est pas toujours facile à obtenir. Cela explique les nombreuses techniques et procédés décrits pour l'obtention des chlamydospores de cette espèce [5, 7, 25].

La formation de chlamydospores par *C. albicans* est très variable suivant les souches. Nous avons pu en isoler qui produisent des chlamydospores au premier repiquage sur gélose pomme de terre-carotte après quarante-huit heures de séjour à 25° ; d'autres n'en produisent qu'après dix à quinze jours. En général 50 p. 100 des souches produisent des chlamydospores sur milieu PC au premier repiquage. La grande majorité produisent des chlamydospores caractéristiques au deuxième passage sur le milieu PC. L'explication de l'action favorable du milieu PC, milieu riche en polyosides, sur la formation de chlamydospores peut être recherchée dans les récents travaux de Nickerson et Mankowski [46]. Ces auteurs montrent l'importance d'un polyoside comme l'amidon purifié, dépourvu de glucose, dans la filamentation de *C. albicans*. L'addition de glucose ou de cystéine à un milieu synthétique à base d'amidon comme source de carbone, de sulfate d'ammonium comme source d'azote et de biotine comme facteur de croissance empêche la filamentation et la formation de chlamydospores de *C. albicans*.

Dans le tableau III nous mentionnons 7 souches qui, au premier repiquage n'ont pas donné de chlamydospores. Au deuxième repiquage sur PC, 5 de ces 7 souches ont produit des chlamydospores typiques en trois jours. Les deux autres souches ont produit des chlamydospores caractéristiques au premier repiquage sur PC après un passage sur le milieu de Levine-éosine-bleu de

méthylène (LEM) ou sur le milieu peptoné à 10 p. 100, en atmosphère enrichie en CO_2 et à 37° .

TABEAU III. — Production de chlamydospores par 7 souches de *C. albicans*.

N° des souches	1 ^{er} REPIQUAGE PC	2 ^e REPIQUAGE PC	1 ^{er} REPIQUAGE PC après passage sur milieu LEM/ CO_2 ou peptone/ CO_2
<i>C. albicans</i> 28. . . .	—	+	+
<i>C. albicans</i> 42. . . .	—	—	+
<i>C. albicans</i> 74. . . .	—	+	+
<i>C. albicans</i> 77. . . .	—	+	+
<i>C. albicans</i> 78. . . .	—	+	+
<i>C. albicans</i> 102. . . .	—	—	+
<i>C. albicans</i> 105. . . .	—	+	+

La souche de *Candida* n° 161, fraîchement isolée d'un crachat de malade, ne forme pas de chlamydospores sur pomme de terre-carotte ni au premier repiquage, ni au second. Une culture en atmosphère CO_2 à 37° pendant quarante-huit heures sur milieu LEM ou simplement sur milieu peptoné, repiquée sur PC à 25° donne en quarante-huit heures les chlamydospores caractéristiques de *C. albicans*. En utilisant cette méthode le diagnostic d'espèce a pu être établi en quatre jours.

TABEAU IV. — Morphologie d'une souche de *C. albicans* sous différentes conditions de culture. Chaque flèche indique un repiquage.

Conditions de culture	Milieux de culture	Morphologie		
		chlamydospores	filaments	levures
air - 25° 48 h.	gélose Sabouraud	-	-	-
	gélose PC	-	-	+
CO_2 - 37° 48 h.	gélose LEM	atypiques	+	+
	gélose peptone	atypiques	+	+
	gélose PC	-	+	+
air - 25° 48 h.	gélose PC	typiques	+	+
	gélose PC	typiques	+	+

L'augmentation de la tension en CO_2 comme facteur stimulant la filamentation avait été signalée depuis longtemps, mais l'emploi

pratique de cette observation dans la détermination des *Candida* n'avait pas été envisagé. La méthode de Weld de différenciation de *C. albicans* des autres *Candida* dans une atmosphère enrichie en CO_2 à 37° nous a paru pratique et bonne surtout dans les cas où la formation de chlamydospores caractéristiques de *C. albicans* n'était pas obtenue après deux passages sur PC. Par cette méthode nous avons étudié 24 souches de *C. albicans*, 1 souche de *C. tropicalis*, 1 de *C. guillermonti*, 1 de *C. pseudotropicalis* et 1 de *C. parakrusei*. Seules les souches de *C. albicans* fournissent des colonies filamenteuses en quarante-huit heures à 37° en atmosphère de CO_2 sur le milieu LEM ou le milieu simplifié à 10 p. 100 de peptone ; les autres *Candida* forment seulement des colonies levuriformes. Les colonies de *C. albicans* présentent un pseudomycélium avec des blastospores en grappes et surtout des filaments terminés par une spore ronde, de dimensions beaucoup plus grandes que les spores habituelles. Cette forme ronde n'a pas la paroi épaisse des chlamydospores typiques obtenues sur milieu pomme de terre-carotte, mais elle peut être considérée comme une chlamydospore atypique ; elle a seulement été observée chez *C. albicans*. Le repiquage sur PC à 25° à l'air fait apparaître en trois à quatre jours des chlamydospores caractéristiques.

2° *Fermentations*. — La fermentation des sucres par la technique des tubes d'Yvan Hall nous a paru d'une grande utilité pratique. Beaucoup plus simple que celle des tubes à tampon de paraffine, elle a la même sensibilité. Les résultats obtenus pour les différentes souches étudiées sont constants si les précautions sont prises de travailler dans les mêmes conditions : cultures jeunes, température constante autour de 25° , même inoculum. Le pH de départ (5,1 ou 7,4) n'a pas influencé la marche des fermentations. L'addition d'un indicateur coloré pour mesurer l'acidité, quoique abandonnée par Langeron, nous paraît toutefois utile. L'acidité précède la fermentation gazeuse et peut permettre d'orienter plus tôt le diagnostic. Dans le cas d'une faible fermentation, celle du raffinose par exemple, le virage très net de l'acidité peut attirer l'attention sur une très faible fermentation. Des expériences ont été faites en remplaçant le milieu peptoné de base par des milieux contenant comme source d'azote le sulfate d'ammonium ou l'hydrolysate de caséine à 10 p. 1 000, biotine 10^{-9} , thiamine 10^{-6} , solution de Berthelot X gouttes p. 1 000 avec ou sans tampon phosphate. Ces milieux ont permis les mêmes fermentations des sucres que le milieu peptoné. C'est pourquoi nous sommes restés fidèles au milieu classique peptoné à 10 p. 1 000. Si l'intensité de fermentation peut varier, nous n'avons pas observé, avec la technique utilisée, de modifications des caractères fermentaires pour des souches maintenues en collection depuis plus de quinze ans ; de même, pour des souches plus récemment isolées et recon-

trôlées périodiquement. Ces observations sont en concordance avec les données de Langeron et de Lodder, mais non avec celles de Benedek [4]. D'après Skinner [22] cela tient aux techniques de fermentation employées.

La fermentation des sucres nous paraît une méthode très fidèle, permettant à elle seule la détermination de nombreuses espèces de *Candida*.

3° *Assimilation des sucres, des substances azotées et besoins en vitamines.* — Les tests auxanographiques de Beijerinck ont trouvé de plus en plus de valeur dans la classification des levures [13, 25]. D'après Wickerham les tests d'assimilation du carbone sont plus sensibles en ce qui concerne la détection des systèmes enzymatiques que ceux des fermentations des sucres.

Avec la technique des disques de papier et l'utilisation d'un milieu synthétique contenant les vitamines exigées pour la croissance, les tests d'assimilation du carbone et de l'azote sont d'application rapide et facile. Les résultats sont plus précis qu'avec les autres techniques. Les substances carbonées utilisées ont été le glucose, le saccharose, le maltose, le lactose et le raffinose quoique, d'après Wickerham, il y aurait intérêt dans l'avenir à augmenter le nombre des composés carbonés.

En ce qui concerne les substances azotées, Lodder [12, 13] a montré avec justesse que seule l'assimilation du nitrate a une valeur taxonomique. En effet toutes les espèces de *Candida* utilisent le sulfate d'ammonium, l'asparagine, l'urée et la peptone, substances employées couramment jusqu'à présent pour la différenciation des *Candida*. Le nitrate de potassium seul permet d'observer des différences ; ce produit n'est assimilé que par *Candida pelliculosa*. En ce qui concerne l'urée, sujette à résultats contradictoires, les divergences proviennent d'après Wickerham [24] des concentrations toxiques d'urée et du milieu de base déficient en vitamines. Toutes les souches de *Candida* que nous avons étudiées assimilent l'urée.

En ce qui concerne le besoin en vitamines, Schopfer [20] et Burkholder [3, 4] ont étudié de très nombreux *Candida* et ont trouvé que la biotine était facteur essentiel de croissance pour de nombreuses espèces comme *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. parakrusei*, etc. ; d'autres espèces sont stimulées par la thiamine ou l'exigent ; d'autres enfin sont auxoautotrophes. D'après Schopfer, l'auxohétérotrophie paraît indépendante de la position systématique des *Candida* ; dans la même espèce, par exemple *C. tropicalis*, il y a des souches et variétés auxoautotrophes et d'autres auxohétérotrophes. Rogosa [18] trouve 3 souches de *C. pseudotropicalis* qui sont déficientes en acide nicotinique, ainsi que d'autres levures qui fermentent le lactose.

Nous avons étudié le besoin en vitamines de 11 souches de

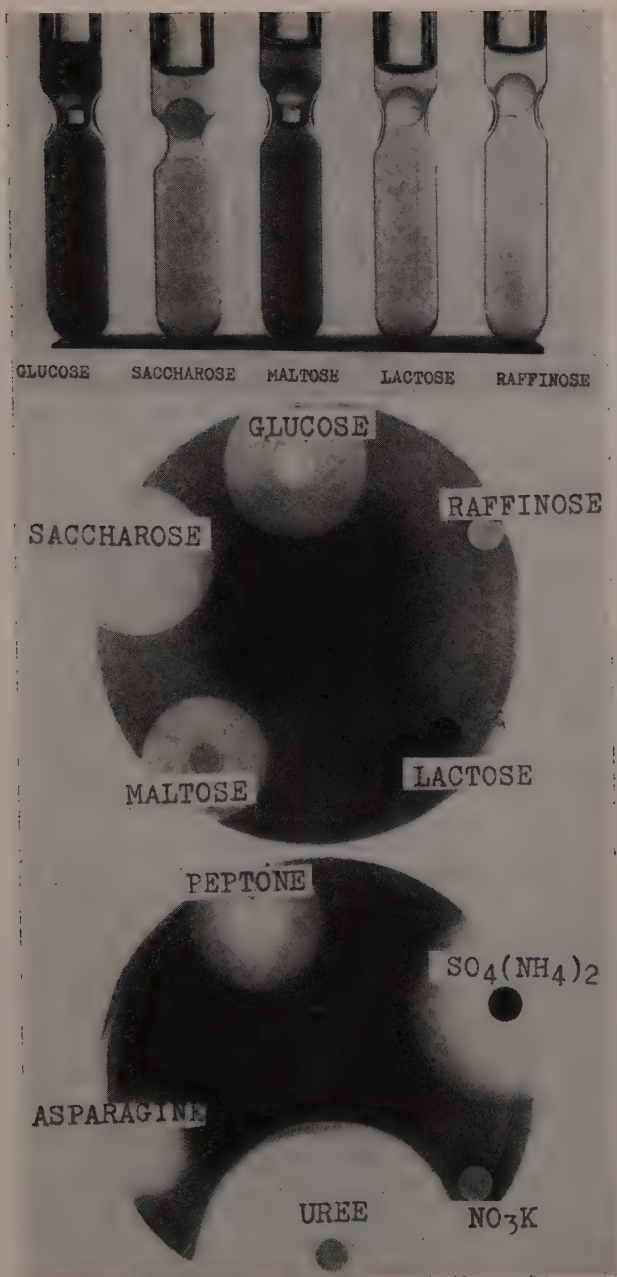


FIG. 1. — Haut : fermentation des sucres par *C. albicans* suivant la technique des tubes d'Yvan Hall. Les bulles d'air se sont formées seulement dans les tubes glucose et maltose : la couleur sombre de ces tubes est due au virage au rouge de l'indicateur. Milieu et bas : auxanogrammes du carbone et de l'azote suivant la technique des disques de papier.

Candida albicans, 2 souches de *C. guilliermondi*, 2 souches de *C. tropicalis*, 1 souche de *C. pelliculosa*, 4 souches de *C. krusei*. Toutes les souches, à l'exception de celles de *C. krusei* qui sont auxoautotrophes, exigent la biotine comme seul facteur essentiel de croissance. Pour pouvoir faire des besoins en vitamines un critère de classification, il faudra étendre l'étude à un nombre plus grand de souches de la même espèce, souches rigoureusement déterminées (1).

4° *Pouvoir pathogène des Candida.* — *Candida albicans* : Le pouvoir pathogène de *C. albicans* pour le lapin s'est montré d'une constance remarquable. Une vingtaine de souches de *C. albicans* inoculées par voie intraveineuse au lapin ont provoqué toujours la mort de l'animal en trois à sept jours. La mort est souvent précédée d'une paralysie du train postérieur. Ce pouvoir pathogène est constamment retrouvé, même pour des souches d'isolement ancien.

Le tableau anatomo-pathologique du lapin infecté par *C. albicans* est décrit en détail par G. Segretain [21]. Il a été retrouvé dans la plupart des cas. A l'autopsie on remarque les poumons fortement congestionnés, les reins gros et présentant souvent des microabcès, les méninges congestionnées. A l'examen des coupes, la coloration de Dominici donne d'intéressants détails sur l'aspect des parasites et le type des lésions et la coloration de Hotchkiss sur la morphologie des éléments mycosiques ; par contre, l'hématoxyline-éosine colore mal les *Candida*. *C. albicans* se présente dans tous les cas sous forme filamenteuse à articles de longueur variable et sous forme de levures rondes ou ovales, bourgeonnantes. La forme filamenteuse prédomine surtout dans le rein et dans le cerveau. Dans les poumons nous n'avons pu déceler de parasites ; la rate présente peu de parasites ; en revanche le rein et le cerveau, dans leurs zones corticales, présentent de nombreux abcès et infiltrats inflammatoires dans lesquels on trouve des amas de filaments assez longs et des levures. Dans le cerveau, la filamentation est particulièrement marquée et on voit souvent des filaments entourés ou non d'une faible réaction cellulaire. Les infiltrats périvasculaires sont fréquents. Les rétrocultures des organes internes sont positives.

Candida tropicalis : Croizat et Rousset [4 bis] avaient signalé qu'une souche de *C. tropicalis* provoquait chez le lapin une infection non mortelle ; le lapin présentait dix jours après l'inoculation

(1) Dernièrement nous avons étudié quatre souches de *C. pseudotropicalis* qui exigent la biotine et l'acide nicotinique comme facteurs essentiels de croissance. Le besoin en vitamines pour la croissance et la relation avec la position systématique des *Candida* feront l'objet d'une publication ultérieure.

des lésions du rein de type infarctus. Mackinnon [14, 15] a obtenu des lésions semblables, qu'il appelle lésions « d'élimination », parce qu'elles sont provoquées par l'élimination des filaments.

Sur 6 souches de *C. tropicalis* cultivées, 3 souches inoculées immédiatement après leur isolement provoquent la mort du lapin au bout de sept jours. Les lésions anatomo-pathologiques du lapin sont semblables à celles provoquées par *C. albicans* : même tableau macroscopique, même type d'abcès, infiltrats inflammatoires, congestion, etc. La seule différence que nous avons trouvée réside dans la forme des parasites. Dans l'infection à *C. tropicalis* prédominent les formes levures, les rares filaments observés sont à articles courts, aux extrémités plus ou moins renflées. Les trois autres souches de *C. tropicalis*, non mortelles pour le lapin, ont toutefois provoqué des lésions rénales et cérébrales du type abcès avec des parasites levuriformes, comparables aux lésions précédentes.

Autres Candida : Aucune autre espèce de *Candida* ne s'est montrée pathogène pour le lapin.

CONCLUSION ET RÉSUMÉ.

Les caractères morphologiques et physiologiques de 78 souches de *Candida* isolées de divers prélèvements pathologiques ont permis l'identification de *C. albicans* (45 souches), *C. tropicalis* (10 souches), *C. pseudotropicalis* (8 souches), *C. krusei* (6 souches), *C. guilliermondi* (3 souches), *C. parakrusei* (1 souche), *C. pelliculosa* (1 souche). Certaines souches de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* et *C. parakrusei* ont provoqué des manifestations pathologiques évidentes, souvent consécutives à un traitement intense par les antibiotiques.

L'apparition de chlamydospores caractéristiques de *C. albicans* a été provoquée dans la majorité des souches après deux cultures successives de trois jours sur le milieu gélose pomme de terre-carotte à 25°. Une nouvelle méthode de culture sur milieu peptoné à 37° en atmosphère de 10-20 p. 100 de CO₂ a permis une rapide identification de souches de *C. albicans* ; cette méthode s'est montrée utile pour l'identification de souches difficilement productrices de chlamydospores.

Les modifications apportées aux techniques fermentaires et auxanographiques se sont montrées d'intérêt pratique et fidèles, permettant la détermination des caractères physiologiques des souches isolées.

100 p. 100 des souches de *C. albicans* provoquent une infection mortelle du lapin en trois à sept jours, ainsi que 50 p. 100 des souches de *C. tropicalis* ; aucune autre espèce de *Candida* ne s'est montrée pathogène pour le lapin.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] T. BENEDEK. *Mycopathologia*, 1943, **3**, 346.
- [2] R. BENHAM. *J. infect. Dis.*, 1931, **49**, 183.
- [3] P. R. BURKHOLDER. *Amer. J. Bot.*, 1943, **30**, 206.
- [4] P. R. BURKHOLDER. I. Mc VEIGH et D. MOYER. *J. Bact.*, 1944, **48**, 385.
- [4 bis] CROIZAT et ROUSSET. *Ann. Parasit.*, 1933, **11**, 26.
- [5] M. H. FUSILLO, D. L. LEARNARD et S. M. DOZIER. *Amer. J. Clin. Path.*, 1952, **22**, 83.
- [6] R. D. HOTCHKISS. *Arch. Biochem.*, 1948, **16**, 131.
- [7] A. M. KLIGMAN. *J. Invest. Dermat.*, 1950, **14**, 173.
- [8] A. M. KLIGMAN. *J. Amer. Med. Ass.*, 1952, **149**, 979.
- [9] M. LANGERON et P. GUERRA. *Ann. Parasit.*, 1938, **16**, 36, 162, 429 et 481.
- [10] M. LANGERON et P. LUTERAAN. *Ann. Parasit.*, 1947, **22**, 254.
- [11] M. LANGERON et P. LUTERAAN. *Ann. Parasit.*, 1949, **24**, 145.
- [12] J. LODDER. *Die anaskosporogenen Hefen*, Akad. Westenscappen, Amsterdam, 1934.
- [13] L. LODDER et N. J. W. KREGER-VAN RIJ. *The Yeasts*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1952.
- [14] J. E. MACKINNON. *Ann. Fac. Med. Montevideo*, 1936, **21**, 320.
- [15] J. E. MACKINNON et R. C. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE. *J. Bact.*, 1945, **49**, 317.
- [16] W. J. NICKERSON et Z. MANKOWSKI. *J. infect. Dis.*, 1953, **92**, 20.
- [17] R. MORQUER, E. PUGET et A. BAZEK. *VI^e Cong. Intern. Microb. Roma*, septembre, 1953.
- [18] M. ROGOSA. *J. Bact.*, 1943, **46**, 435.
- [19] E. RIVALIER et S. SEYDEL. *Ann. Parasit.*, 1932, **10**, 442.
- [20] W. H. SCHOPFER. *C. R. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève*, 1944, **61**, 232.
- [21] G. SEGRETAINE. *Ces Annales*, 1947, **73**, 674.
- [22] C. E. SKINNER. *Bact. Rev.*, 1947, **11**, 227.
- [23] J. T. WELD. *Arch. Dermat. Syphil.*, 1953, **66**, 691 ; **67**, 473.
- [24] L. J. WICKERHAM. *J. Bact.*, 1946, **52**, 293.
- [25] L. J. WICKERHAM. *Tech. Bull.*, n° 1029, 1951.
- [26] J. W. WOODS, I. H. MANNING et C. N. PATTERSON. *J. Amer. Med. Ass.*, 1951, **145**, 207.
- [27] Depuis la rédaction de ce travail, nous avons trouvé quelques souches déficientes en pyridoxine et nous ajoutons cette vitamine au milieu de base servant à l'assimilation des sucres et de l'azote, à la concentration de 10^{-6} .

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Culture sur lame de *C. albicans*. Les filaments mycéliens portent des blastospores et des chlamydospores. $\times 87$.

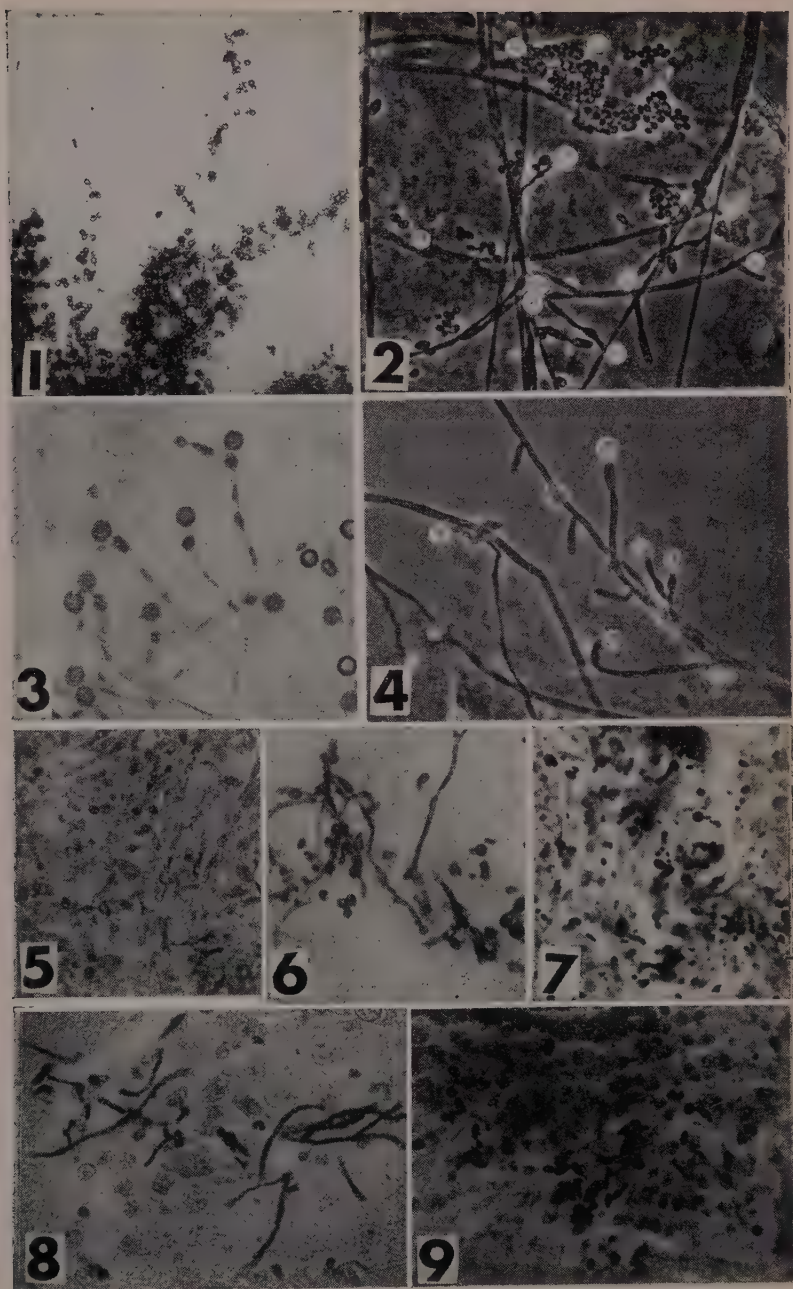


FIG. 2 et 4. — Chlamydospores brillantes de *C. albicans* vues au microscope à contraste de phase; les filaments, les blastospores et le fond de la préparation restent sombres; les préparations ont été obtenues par simple écrasement entre lame et lamelle d'un fragment de culture sur gélose de pomme de terre-carottes. $\times 380$.

FIG. 3. — Culture sur lame de *C. albicans*. Coloration érythrosine-bleu trypan. Les chlamydospores sont colorées en rouge, les filaments en bleu.

FIG. 5. — Coupe de rein de lapin inoculé avec *C. albicans* (coloration de Dominici); les filaments mycéliens sont difficilement observables. $\times 410$.

FIG. 6. — Même coupe que la précédente (coloration de Hotchkiss à l'acide periodique). Les filaments et les quelques levures sont bien mis en évidence.

FIG. 7. — Coupe de rein de lapin inoculé avec *C. tropicalis* (coloration de Hotchkiss). Les seules formes levures se présentent dans les lésions d'infiltration.

FIG. 8. — Cerveau de lapin à *C. albicans*. Les formes filamenteuses prédominent. $\times 410$.

FIG. 9. — Cerveau de lapin à *C. tropicalis*. Les formes levures prédominent dans les lésions de type abcès. $\times 410$.

ROLE DES ANTICORPS ANTIPOLYOSIDIQUES DANS L'AGGLUTINATION DES BACILLES TYPHIQUES (*)

par ANNE-MARIE STAUB (**.)

(Institut Pasteur, Service des Vaccins.)

Le tableau de White-Kauffmann, où les *Salmonelles* sont caractérisées par leurs antigènes O et H, rend tous les jours les plus grands services aux bactériologistes ; mais l'immunochimiste aimerait déterminer la formule des antigènes désignés dans cette classification par des chiffres et des lettres.

La nature des agglutinogènes « O », désignés dans ce tableau par les chiffres romains, a fait depuis longtemps l'objet de nombreux travaux (1) qui ont permis d'établir d'une façon certaine le rôle joué par les polyosides dans l'agglutination des *Salmonelles* ; toutefois la preuve n'est pas faite que les polyosides sont seuls à y jouer un rôle. En d'autres termes, s'il est certain que les antigènes I-IX-XII contiennent des polyosides, ne contiennent-ils rien d'autre intervenant dans la spécificité ?

C'est à cette question que nous avons essayé de répondre en utilisant le polyoside O extrait des germes, soit par hydrolyse acétique (et purifié suivant la technique de Freeman [3]), soit par hydrolyse alcaline.

MATÉRIEL.

Souche. — *S. typhi* O 901 de la collection conservée au Centre des *Salmonelles* de l'Institut Pasteur.

Polyoside extrait par hydrolyse acétique. — Nous avons suivi exactement la technique indiquée par Freeman [3]. 50 g de germes sont hydrolysés à trois reprises pendant une heure trente par 1 l d'une solution décimale d'acide acétique. Les hydrolysats sont concentrés sous vide et purifiés exactement, comme nous l'avons indiqué dans un article antérieur [13].

Polyoside extrait par hydrolyse alcaline. — Nous avons utilisé une solution N/4 de soude pendant cinq heures à 56°, suivant les données de Thomas et Mennie [15], puis nous avons purifié cet extrait par des précipitations alcooliques et trichloracétiques, et finalement par

(*) Manuscrit reçu le 20 janvier 1954.

(**) Une grande partie des résultats relatés dans ce mémoire a fait l'objet d'une communication au VI^e Congrès International de Microbiologie de Rome (septembre 1953).

(1) Cf. entre autres le bref historique rappelé au début de notre communication à la Soc. de Chimie biologique (Pon et Staub [11]).

une extraction phénolique. Le polyoside ainsi obtenu contient de 0,6 à 1 p. 100 d'azote (2). Nous l'appellerons polyoside « alcalin » pour le distinguer du polyoside « acide » précédent.

Antigène de Boivin. — Il est préparé suivant la technique exacte donnée par Mesrobian dans sa thèse et rappelée dans un de nos mémoires [43].

Sérums. — Nous avons utilisé de nombreux sérums antityphiques de lapin et 3 sérums de cheval : un sérum antiparatyphique B et 2 sérums antityphiques provenant de deux saignées, à un an d'intervalle, d'un même cheval.

Tous ces animaux avaient été immunisés par l'injection de germes chauffés une heure à 100°, sauf quelques lapins qui avaient été immunisés par injection de l'antigène somatique de Boivin absorbé sur de l'alumine (les détails de l'immunisation sont les mêmes que dans [43]).

TECHNIQUES.

Agglutination. — Nous avons utilisé les suspensions O de germes typhiques préparées par le Service des Vaccins de l'Institut Pasteur. Les germes sont tués par l'alcool. La suspension contient environ 500 millions de germes par centimètre cube.

Nous avons été obligée de travailler avec des dilutions fortes de sérum (1/100 et au-dessous). Ceci nous amena à modifier légèrement la technique classique d'agglutination. Nous avons ajouté à 1 cm³ de chaque dilution du sérum 0,1 cm³ de la suspension microbienne concentrée dix fois. Dans la technique classique, on ajoute 0,9 cm³ de suspension microbienne à 0,1 cm³ de sérum dont la dilution finale est ainsi dix fois plus forte.

Les dilutions de sérums s'étagaient de 1/100 à 1/12 800 (1/100, 1/200, 1/400, etc.).

La lecture de l'agglutination était faite soit après centrifugation, soit après deux heures d'étuve et une nuit à la température du laboratoire. Les deux techniques donnent des résultats sensiblement identiques.

Précipitation. — Les courbes de précipitation ont été établies suivant la technique de Heidelberger et Kendall [6], telle que nous l'avons rappelée [43].

Hémagglutination (3). — a) *Sensibilisation des globules rouges :* Les

(2) Les détails de la préparation, ainsi que l'analyse chimique et immunochimique de ce polyoside, seront consignés dans un mémoire en cours de rédaction (*Bull. Soc. Chim. biol.*).

(3) Par souci de simplification, nous utiliserons au cours de ce mémoire le terme d'hémagglutination lorsqu'il s'agira de l'agglutination des globules rouges chargés en polyoside par les anticorps antipolyosidiques. Pour la même raison, nous appellerons « hémagglutinines » les antipolyosides qui agglutinent les globules ainsi chargés, « précipitines » ceux qui sont précipités par le polyoside en solution et agglutinines ceux qui agglutinent les germes microbiens ; mais il est bien entendu que les mêmes antipolyosides pourront être des hémagglutinines, des précipitines ou des agglutinines suivant la technique utilisée pour les mettre en évidence.

globules lavés avec de la solution physiologique (NaCl 0,85 p. 100) sont mis en suspension dans la solution de polyoside et agités doucement pendant deux heures à 37°. On les lave ensuite trois fois avec la solution physiologique, et on remet 1 cm³ en suspension dans 100 cm³ de cette même solution (suspension à 1 p. 100).

b) *Hémagglutination* : Il gouttes de chaque dilution du sérum sont mélangées dans des tubes de Kahn à 1 goutte de la suspension à 1 p. 100 de globules sensibilisés. On met les tubes une heure dans un bain-marie à 37° et on lit la réaction d'après l'aspect des culots, à la sortie du bain-marie ou vingt-quatre heures après, suivant les indications de Middlebrook et Dubos [9]. On sait que les globules non agglutinés se rassemblent au centre du fond du tube, donnant un point sombre très net ; au contraire, lorsque l'agglutination des globules n'est pas suffisante pour former des amas visibles, elle ne leur permet pas de se réunir en un point net au centre du fond ; ils couvrent alors le fond du tube en une couche aux contours plus ou moins irréguliers. La lecture à l'agglutinoscope nous a toujours donné les mêmes résultats que la simple observation des culots qui est beaucoup plus rapide.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

A. POLYOSIDE « ACIDE » (de Freeman). — *Relation entre le taux en anticorps agglutinant les germes et le taux en anticorps précipités par le polyoside « acide »*. — Nous avons comparé les taux en agglutinines de 5 sérums de lapin avec leur taux en précipitines (μ g d'azote dosés dans le précipité spécifique obtenu avec le polyoside « acide » au sommet de la courbe de précipitation). La figure 1 montre qu'il n'y a aucun parallélisme entre ces deux titrages. En effet, on voit que le premier et le dernier sérums du schéma possèdent le même titre en agglutinines (1/3 200), bien que leur teneur en précipitines varie du simple au triple (88 μ g et 272 μ g).

Agglutination après élimination des anticorps précipitant avec le polyoside « acide ». — Nous avons précipité tous les anticorps anti-polyoside « acide », en présence d'un léger excès d'antigène, au sommet de la courbe de précipitation. Les « surnageants », obtenus par centrifugation du précipité spécifique, précipitaient bien par adjonction de sérum, ce qui témoignait de l'excès d'antigène. Nous avons alors dosé les agglutinines de ces « surnageants ». Le titre était toujours inférieur à celui des sérums, mais la différence n'était pas grande, surtout avec les sérums de lapin (fig. 2, « sérum absorbé par le polyoside », 2^e barre). Ceci s'oppose à ce qui se passe lorsqu'on élimine de ces mêmes sérums les anticorps précipitables par l'antigène somatique, extrait des germes par l'acide trichloracétique suivant la technique de Boivin. Dans ce cas les agglutinines ont pratiquement disparu, leur titre s'élevant rarement au-dessus de 1/100 (fig. 2, « antigène de

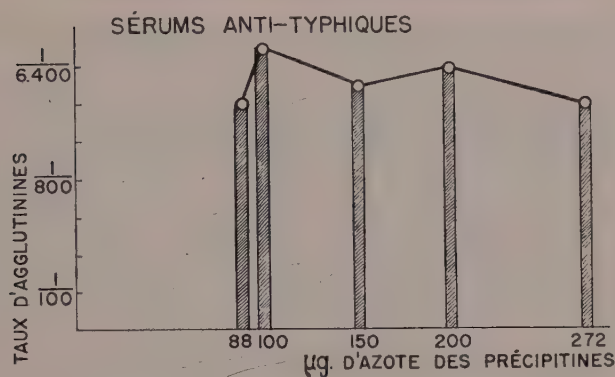


FIG. 1. — Comparaison entre les taux d'agglutinines et de précipitines de divers sérums antityphiques de lapin.

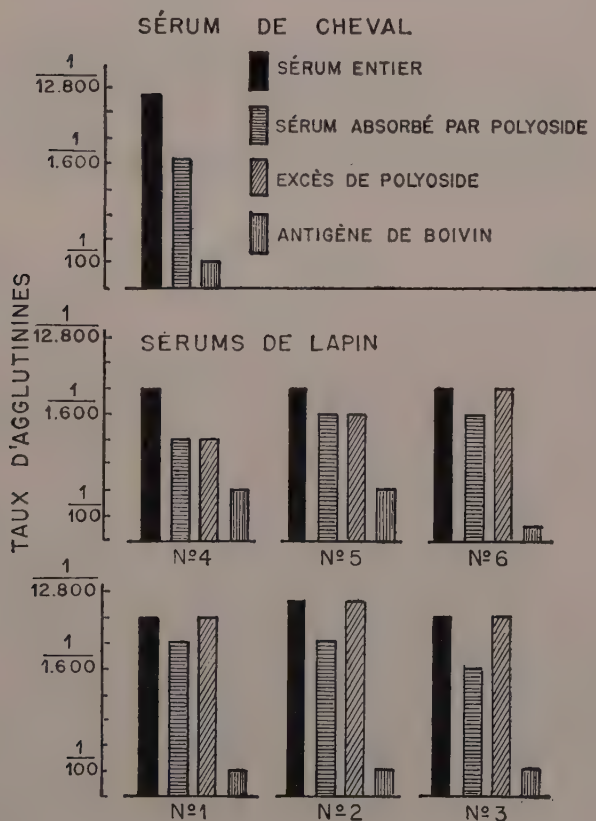


FIG. 2. — Taux d'agglutinines de divers sérums antityphiques après différents essais d'élimination ou d'inhibition.

Boivin », 4^e barre et 3^e barre du sérum de cheval). L'antigène de Boivin contient donc tout l'agglutinogène des germes.

Agglutination en présence d'un grand excès de polyoside. — Grabar et Oudin [5] ont signalé qu'un excès de polyoside inhibait la précipitation des sérums de lapin par l'antigène somatique. Nous-même avons constaté qu'il en était de même avec tous nos sérums de lapin. Puisque cet antigène contient tout l'agglutinogène, il était logique d'essayer également d'inhiber l'agglutination des germes par un grand excès de polyoside, ne permettant plus que la formation de complexes solubles polyoside-anti-polyoside.

Les résultats consignés dans la figure 2 (« excès de polyoside », 3^e barre des sérums de lapin) montrent que non seulement l'agglutination n'est pas inhibée mais que, le plus souvent (sérums n^{os} 1, 2, 3 et 6), le taux d'agglutination est aussi élevé que celui du sérum entier, dépassant ainsi celui mesuré après précipitation du sérum par le polyoside.

Essai de fixation sur les globules rouges. — Conformément aux observations des autres auteurs (Bier, Corvazier, Landy [1]), notre polyoside, extrait des germes par hydrolyse acétique, ne se fixe pas sur les globules rouges, quelle qu'en soit la quantité présente (de 10 à 1 000 μ g par centimètre cube pour une suspension de globules à 1 p. 100).

B. POLYOSIDE ALCALIN. — *Fixation sur les globules rouges.* — Contrairement à ce que l'on observe avec le polyoside précédent, toutes nos préparations de polyoside « alcalin » se fixent très facilement sur les globules rouges de mouton. Le tableau I montre que 1 μ g de polyoside par centimètre cube est la concentration nécessaire et suffisante pour sensibiliser une suspension de globules à 1 p. 100. Bien que, dans l'expérience relatée dans le tableau I a, la sensibilité des globules vis-à-vis des deux sérums de lapin et de cheval n'ait pas été augmentée lorsqu'on les traitait avec une solution de polyoside dix fois plus concentrée (10 μ g/cm³), il nous est arrivé de constater une légère augmentation de la sensibilité des globules ainsi traités vis-à-vis des sérums de lapin ; c'est ce qui nous a fait choisir finalement cette dose de 10 μ g par centimètre cube pour toutes nos sensibilisations ultérieures.

En utilisant une suspension de globules dix fois plus concentrée, on obtient des résultats plus nets et l'existence d'un seuil est manifeste. Les résultats du tableau I b, retrouvés avec des préparations différentes de polyoside « alcalin », montrent que ce seuil se situe entre 0,1 et 0,2 μ g de polyoside par centimètre cube pour une suspension à 1 p. 100 de globules rouges. Ces

résultats seront commentés dans la discussion en fonction des données quantitatives relatées plus loin (p. 629).

TABEAU I. — Concentrations de polyoside nécessaires pour la sensibilisation des globules rouges (G.R.).

I a. 5 cm³ d'une suspension à 2 p. 100 de globules ont été agités deux heures à 37° avec 5 cm³ de solution φ contenant de 0,2 à 800 μ g de polyoside par cm³, puis lavés trois fois par de la solution φ .

Concentration du polyoside utilisée pour la sensibilisation d'une suspension à 1 % de G.R.	Hémagglutination	
	Sérum de lapin antityphique	Sérum de cheval antityphique
0,1 μ g./cm ³	100 ^(°)	100
1 μ g./cm ³	12.800	25.000
10 μ g./cm ³	12.800	25.000
100 μ g./cm ³	-	25.000
400 μ g./cm ³	-	25.000
(°) inverse de la dilution du dernier tube présentant une hémagglutination nette.		

I b. 1 cm³ d'une suspension à 20 p. 100 de G.R. a été agité deux heures à 37°, avec 1 cm³ de solution φ contenant 1 à 20 μ g de polyoside. Les globules lavés trois fois par de la solution φ ont été ensuite mis en suspension dans 20 cm³ de solution φ afin d'obtenir une suspension à 1 p. 100 pour les essais d'hémagglutination.

Dose de polyoside utilisée	Concentration de polyoside correspondante pour une suspension à 1 % de G.R.	Hémagglutination observée avec le sérum antityphique de cheval.
1 μ g.	0,05 μ g./cm ³	100 ^(°)
2	0,1 μ g./cm ³	100
4	0,2 μ g./cm ³	25.000
8	0,4 μ g./cm ³	25.000
12	0,6 μ g./cm ³	25.000
20	1 μ g./cm ³	25.000
(°) inverse de la dilution du dernier tube présentant une hémagglutination nette.		

Alors que tous les lots de globules de mouton ainsi sensibilisés ont toujours été agglutinés par les sérums de cheval, il nous est arrivé de ne pouvoir agglutiner certains d'entre eux avec les sérums de lapin, sans que nous puissions expliquer actuellement la cause de ces échecs, assez rares d'ailleurs.

En présence de complément, les immunosérums de cheval et de lapin lysent les globules rouges chargés en polyoside (4), conformément aux résultats observés par d'autres auteurs avec des globules sensibilisés par d'autres polyosides bactériens [8].

Afin d'apprécier la quantité de polyoside fixée sur les globules, nous avons procédé à un dosage immunologique du polyoside

(4) L'étude quantitative de cette lyse fait l'objet d'un travail en commun avec O. Bier et M. Siqueira, actuellement en cours.

sur le liquide restant après fixation du polyoside sur les globules.

Les globules rouges ont été mis en suspension dans la solution physiologique (solution ϕ) à raison de 20 p. 100 (5 cm³ de culot dans 25 cm³ de solution); après homogénéisation de la suspension, on déterminait le nombre des globules rouges en les lysant et en se rapportant à une courbe d'étalonnage. On distribuait ensuite dans 6 tubes 5 cm³ de suspension (1 cm³ de culot) et 5 cm³ de solution ϕ contenant des quantités variables de polyoside « alcalin » ou de polyoside acide (tableau II). Après deux heures d'agitation à 37°, on centrifugeait et on dosait le polyoside dans le liquide surnageant au moyen de la précipitation d'un sérum antityphique de cheval préalablement étalonné par chacun de ces polyosides (5). Les 3 tubes 4, 5, 6 servaient de témoins, puisque le polyoside acide ne se fixe pas sur les globules. Toute destruction éventuelle du polyoside au cours du traitement aurait été signalée par une baisse en la teneur de ce polyoside. Il n'en est rien : quelles que soient les concentrations présentes, on les retrouve intégralement au cours des dosages (tableau II).

Les résultats des 3 tubes 1, 2, 3 représentent donc bien le polyoside absorbé sur les globules. On voit que les globules rouges (25.10⁹ environ) fixaient totalement les 100 μ g, puis 350 μ g lorsqu'on utilisait 500 μ g, et 520 μ g lorsqu'on utilisait 1 000 μ g.

TABLEAU II. — Dosage des quantités de polyoside fixées sur les globules rouges de mouton.

n°	25.10 ⁹ G.R.** sensibilisés avec	Quantité de polyoside dosée	Quantité de polyoside fixée
1	100 μ g. (0 μ g.	100 μ g.
2	500*) Polyoside	135	365 μ g.
3	1.000 (alcalin	480	520 μ g.
4	100 (Polyoside	100	0
5	500)	500	0
6	1.000 (acide	1.000	0
* La suspension de G.R. contenait 28,5.10 ⁹ G.R. dans cette expérience.			
** G.R. = globules rouges de mouton.			

Les globules de mouton ne sont pas les seuls à fixer le polyoside alcalin. Nous n'avons pas essayé la fixation sur les globules humains utilisés par Thomas et Mennie [15], mais nous avons constaté que les globules de rat, de souris et de lapin le fixent et agglutinent en présence des immunsérums de cheval et de lapin. Toutefois, les globules de lapin donnent des réactions

(5) Pour le détail de cette technique, Cf. [13] et [7].

moins nettes et, dans la suite de ce travail, nous avons toujours utilisé des globules de mouton.

Élimination des anticorps anti-polyoside « alcalin » d'un sérum de cheval. — Après élimination de tous les anticorps précipitables par le polyoside « alcalin », le sérum antityphique de cheval est encore capable d'agglutiner les globules sensibilisés avec le polyoside, quoique à un taux beaucoup plus faible que le sérum non précipité (tableau III, hémagglutinines). Il reste donc des anticorps non précipitables au sommet de la courbe de précipitation. Comme avec le polyoside « acide » la présence d'un grand excès de polyoside « alcalin » n'inhibe ni l'hémagglutination, ni l'agglutination microbienne.

Nous avons alors tenté d'éliminer ces anticorps, qui ne précipitent pas avec le polyoside en solution, en les absorbant par le polyoside fixé sur les globules rouges.

Nous avons préparé plusieurs culots de 1 cm³ de globules non dilués, en les mettant en contact avec 10 cm³ d'une solution de polyoside à 100 µg par centimètre cube. Puis, après 3 lavages avec de la solution physiologique, nous avons laissé chaque culot en contact avec 5 cm³ de diverses concentrations de sérums pendant une heure à 37°. Après centrifugation, le surnageant était remis en contact avec un deuxième culot et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il ne contienne plus d'anticorps capables d'agglutiner les globules chargés avec du polyoside (hémagglutinines).

Le tableau III montre que trois absorptions ne sont pas suffisantes pour le sérum dilué au 1/2, bien qu'il ne reste plus d'anticorps capables de précipiter ce polyoside. Ces trois absorptions

TABLEAU III. — **Élimination des hémagglutinines et des agglutinines d'un sérum antityphique de cheval.**

	Agglutinines	Hémagglutinines	"Ring-test" avec le polyoside alcalin
Sérum entier	1/6.400	1/50.000	+
Sérum précipité par le polyoside acide	1/1.600	-	+
Sérum précipité par le polyoside alcalin	1/800	1/800	-
Sérum après absorption par le polyoside fixé sur les globules rouges			
(1 fois	/	/	+
Sér.au 1/2 absorbé (2 fois	1/800 ±	1/400 ±	±
(3 fois	1/200	1/200 ±	-
Sér.au 1/10 absorbé (2 fois	1/200	1/200	/
(3 fois	< 1/100	< 1/100	-
Sér.au 1/100 absorbé 2 fois	< 1/100	< 1/100	/

sont nécessaires et suffisantes pour le sérum dilué au 1/10. Deux absorptions suffisent pour le sérum dilué au 1/100.

L'étude quantitative du paragraphe précédent nous a montré que 520 μg de polyoside se fixaient sur le culot de globules rouges dans les conditions où nous opérons ; il faut donc 1 560 μg de polyoside, fixé sur les globules rouges, pour absorber les précipitines (« ring-test ») de 2,5 cm^3 de sérum (5 cm^3 au 1/2), alors que 400 μg suffisent lorsque le polyoside est en solution (6). D'autre part, ces mêmes 1 560 μg sont nécessaires pour éliminer les hémagglutinines d'une quantité cinq fois moindre de sérum : 0,5 cm^3 ou 5 cm^3 de sérum au 1/10. (Ces résultats serviront de base à la discussion, p. 629.)

Essai d'élimination des agglutinines des sérums de cheval. — L'élimination progressive des anticorps capables d'agglutiner les globules, chargés avec notre polyoside « alcalin », s'accompagne d'une élimination parallèle des anticorps agglutinant les corps microbiens. A l'élimination totale des premiers correspond l'élimination totale des agglutinines microbiennes (tableau III et fig. 3, 2^e ligne, 3^e série).

Dans une expérience effectuée avec le sérum provenant d'autres saignées du même cheval, le parallélisme n'est plus aussi étroit : la troisième absorption du sérum au 1/100 élimine encore totalement les agglutinines d'un des sérums (fig. 3, 2^e ligne, série 1), elle n'est pas encore suffisante pour le troisième sérum, bien que le taux des agglutinines ait considérablement baissé.

La même absorption d'un sérum de cheval antipara B (fig. 3, 1^{re} ligne) montre que, là encore, on supprime les agglutinines typhiques après deux absorptions ; mais cette fois les agglutinines para B contiennent des anticorps spécifiques de *S. para B* distincts des agglutinines typhiques et qui ne sont pas absorbés par le polyoside extrait de *S. typhi*, en sorte que le taux des agglutinines para B ne varie pas au cours des trois absorptions.

L'absorption des sérums antityphiques de cheval par le polyoside alcalin élimine spécifiquement les agglutinines.

Essai d'élimination des agglutinines des sérums de lapin. — 5 sérums de lapin (préparés par injection des germes tués aux lapins) possédaient des titres en agglutinines typhiques oscillant entre 1/400 et 1/3 200 et s'avéraient capables d'agglutiner une suspension de *S. para B* à des taux oscillant entre 1/400 et 1/800. Nous les avons saturés par le polyoside « alcalin » fixé sur les globules rouges, suivant exactement la même technique que celle utilisée pour les sérums de cheval.

(6) En effet, le point d'équivalence de la courbe B, figure 4, est à 80 μg . Or cette courbe a été établie avec 0,5 cm^3 de sérum. Il faut donc cinq fois plus (400 μg) pour précipiter les précipitines de 2,5 cm^3 .

Les agglutinines para B ont toujours diminué et, dans 3 sérums

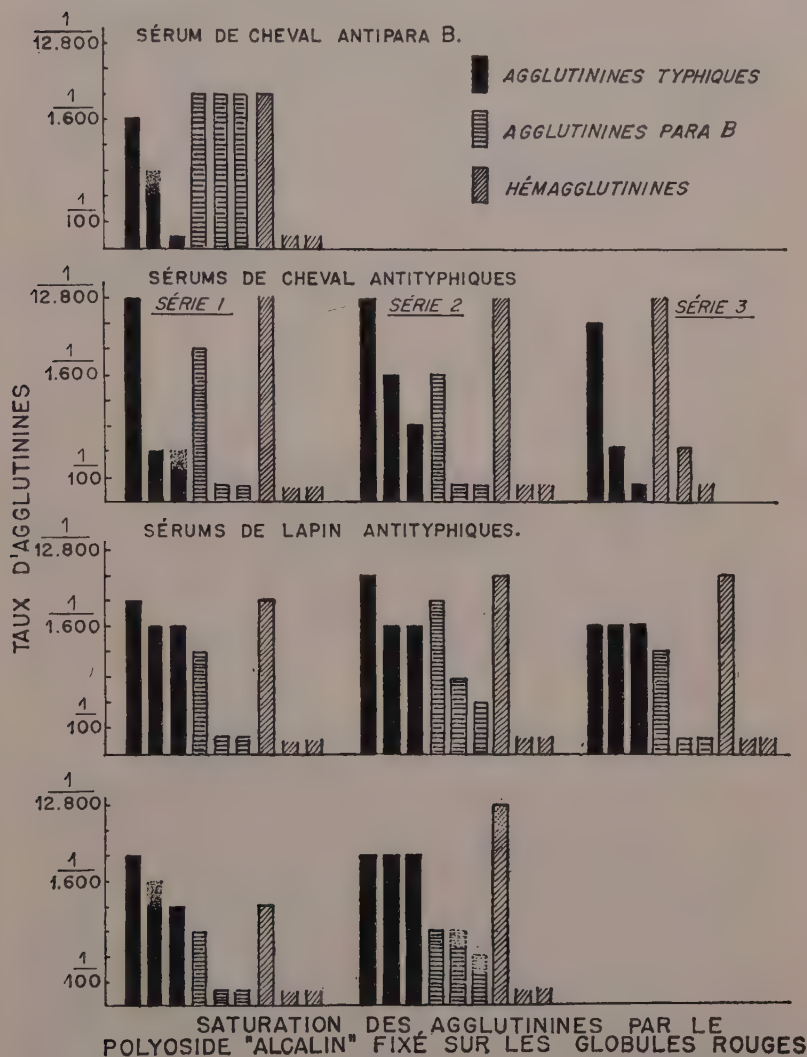


FIG. 3. — Essais d'élimination des agglutinines typhiques de divers sérums de cheval et de lapin par le polyoside « alcalin » fixé sur des globules rouges de mouton. Chacune des barres dans les trois groupes d'anticorps correspond au taux des anticorps après une et deux absorptions de 5 cm³ de sérum au 1/100 par 1 cm³ de globules rouges ayant fixé 520 µg de polyoside.

sur 5, elles ont même disparu ; par contre, assez paradoxalement à première vue, le taux des agglutinines typhiques est resté le

même pour 2 sérums et n'a que peu baissé pour les 3 autres (7). Dans tous les cas une seule absorption était suffisante pour éliminer les anticorps agglutinant les globules rouges chargés avec le polyoside, et pour produire la baisse maximum des agglutinines (fig. 3. Sérums lapin, 3^e et 4^e lignes).

L'absorption des sérums de lapin par le polyoside alcalin ne supprime pas les agglutinines.

Courbes de précipitation des sérums de cheval et de lapin par

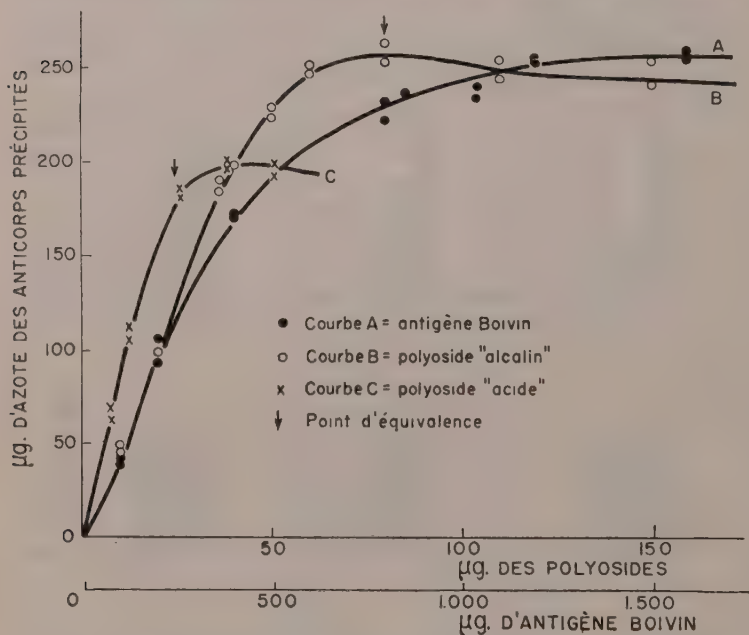


FIG. 4. — Courbes de précipitation d'un sérum de *cheval* antityphique par l'agglutinogène de Boivin et les deux polyosides.

les deux polyosides « acide » et « alcalin » et par l'antigène de Boivin. — La différence observée entre les agglutinines des sérums de cheval et de lapin nous incita à établir les courbes de précipitation de ces sérums avec les deux polyosides et l'antigène de Boivin (qui contient l'agglutinogène). Cette étude donna les résultats traduits sur les deux figures 4 et 5.

(7) Il est possible que la disparition des agglutinines para B après absorption par le polyoside fixé sur les globules rouges soit due à leur taux, plus faible généralement que le taux des agglutinines typiques ; mais il est possible aussi que les antigènes communs contiennent surtout les motifs antigéniques présents dans notre polyoside « alcalin ».

On voit qu'avec le sérum de cheval (fig. 4) :

1° 80 p. 100 des anticorps précipités par l'antigène de Boivin sont précipités par le polyside « acide » (courbe C).

2° Le polyside « alcalin » (courbe B) précipite autant d'anticorps que l'antigène de Boivin (courbe A) et donc plus que le polyside acide.

Avec le sérum de lapin (fig. 5) :

1° 50 p. 100 seulement des anticorps précipités par l'antigène

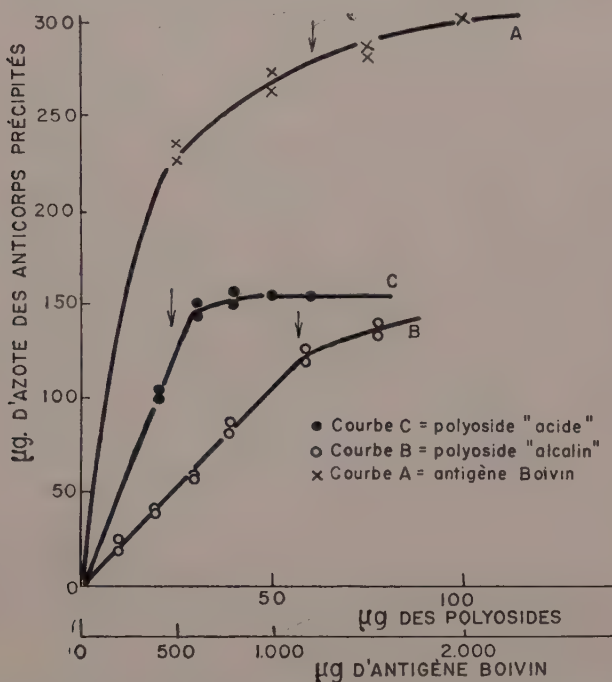


FIG. 5. — Courbes de précipitation d'un sérum de lapin antityphique par l'agglutinogène de Boivin et les deux polysides.

de Boivin (courbe A) sont précipités par le polyside acide (courbe C).

2° Le polyside alcalin (courbe B) précipite à peine autant d'anticorps que le polyside acide, donc sensiblement 50 p. 100 des anticorps précipités par l'antigène de Boivin.

DISCUSSION.

Les résultats expérimentaux acquis au cours de ce travail montrent bien que certains groupements doivent être présents

dans les polyosides pour que ceux-ci se fixent sur les globules rouges ; ils soulignent l'intérêt, pour une étude immunologique, de pouvoir fixer sur un support insoluble les antigènes solubles ; ils apportent enfin quelques faits nouveaux sur la spécificité des agglutinines typhiques des sérums de cheval et de lapin.

1° *Fixation du polyoside « alcalin » sur les globules rouges.* — Nous ne savons pas encore pourquoi notre polyoside, extrait des germes par hydrolyse alcaline, se fixe sur les globules rouges, alors que le polyoside extrait par hydrolyse acide ne se fixe pas.

Il est certain que cela n'est pas dû à une contamination possible par des protéines, puisque des préparations de polyoside « alcalin », contenant le même taux d'azote (non dû à la glucosamine) que le polyoside acide, se fixent aussi bien sur les globules. De plus, au cours de la purification de notre polyoside, on constate qu'il se fixe d'autant mieux qu'il est plus pauvre en azote.

Les seuls constituants du polyoside « alcalin » absents du polyoside « acide » sont la glucosamine et quelques acides gras ; mais aucun fait ne nous permet de les rendre responsables de la fixation. Néanmoins, nous avons constaté que la lécithine inhibe la fixation de notre polyoside (8) sur les globules rouges, comme d'autres auteurs l'ont observé pour un polyoside tuberculeux [2 b] ou pour des extraits de *B. coli* [40]. Ceci serait en faveur du rôle des acides gras qui, ayant fixé la lécithine, ne pourraient plus se fixer sur les lipides de la surface globulaire responsables de la fixation de *Pf. mallei* [2 a] et du polyoside tuberculeux [2 b et 4].

L'étude quantitative de la page 624 nous a montré que, lorsqu'on mettait 100 µg de polyoside en présence de 25×10^9 globules rouges (1 cm³ de culot), ces 100 µg étaient complètement fixés (tout au moins il ne restait plus de polyoside immunologiquement décelable) : ceci correspond à 1 µg pour 1 cm³ d'une suspension de globules rouges à 1 p. 100, dose nécessaire et suffisante pour sensibiliser les globules rouges.

On peut essayer de calculer combien de molécules sont fixées sur chaque globule. Le calcul montre que, si l'on accorde au polyoside un P. M. de 10^6 , valeur maximum vraisemblablement trop forte (9), chaque globule fixant :

$$\frac{100}{25 \times 10^9} = 4 \times 10^{-9} \text{ µg ou } 4 \times 10^{-15} \text{ g.}$$

(8) Une concentration de 1/5 000 empêche la fixation de 1 µg de polyoside sur les globules de 1 cm³ d'une suspension à 1 p. 100, mais n'empêche pas la fixation de 10 µg.

(9) Cette valeur de 10^6 est, en effet, celle donnée par Schramm, Westphal et Luderitz [42] pour un complexe extrait de *B. coli*, très voisin du même complexe extrait de *S. typhi* dont notre polyoside n'est qu'une fraction.

serait recouvert de

$$\frac{4 \times 10^{-15} \times 6.10^{23}}{10^6} = \boxed{2\,000 \text{ molécules}} \text{ de polyoside.} \quad (4)$$

Pour agglutiner 0,1 cm³ d'une suspension à 1 p. 100 de ces globules contenant 2.10⁷ globules il faut 0,2 cm³ d'une solution à 1/25 000 d'un sérum contenant 500 µg d'azote, soit environ 3 000 µg de protéines anticorps, par centimètre cube ; ce qui donne environ 2.10⁻⁸ g de protéines anticorps dans les 0,2 cm³ au 1/25 000 (10). En supposant que ces anticorps de cheval aient un poids moléculaire moyen de 5.10⁵ (valeur sûrement un peu forte) on obtient $\frac{2.10^{-8} \times 10^{23} \times 6}{5.10^5} = 2.10^{10}$ molécules pour 2.10⁷

globules rouges ou 1 000 molécules pour 1 globule rouge. Si l'on diminue dix fois la concentration en polyoside, il y aura encore d'après (1) 200 molécules fixées sur chaque globule, et pourtant on n'obtient plus d'agglutination, même en augmentant 250 fois la concentration en anticorps, ce qui porterait à 250 000 le nombre de molécules d'anticorps disponibles pour chaque globule. Pour expliquer cette discontinuité brusque, plusieurs hypothèses sont possibles. Il se peut que, pour observer une agglutination, il soit nécessaire qu'un nombre minimum de molécules anticorps soit fixé sur les globules. Il se peut aussi qu'au-dessous de 200 molécules le polyoside dispose d'assez de points de fixation sur les globules pour adhérer complètement à la surface et ne plus présenter de motif antigénique disponible pour les anticorps. Seuls les résultats d'expériences en cours nous permettront peut-être de fournir l'explication convenable.

2° *Élimination des anticorps d'un sérum.* — La technique d'hémagglutination nous a permis de mettre en évidence la présence d'anticorps dans le sérum débarrassé de ses précipitines. Ainsi donc l'élimination des anticorps, homologues d'un antigène donné, peut ne pas être complète lorsqu'on utilise l'antigène en solution, par suite de la formation de complexes antigène-anticorps solubles avec les anticorps non précipitants (Cf. en particulier Kabat [7]) ; elle le devient, par contre, lorsqu'on utilise ce même antigène fixé sur un support insoluble (en l'occurrence des globules rouges).

Dans cette absorption nous avons vu (p. 622) qu'il fallait environ quatre fois plus de polyoside fixé sur les globules que de polyoside en solution pour éliminer les précipitines : ceci s'explique si une partie des « motifs antigéniques » du polyoside est bloquée par sa fixation sur les globules. Nous avons vu aussi

(10) Ce calcul est établi en ne tenant compte que des anticorps précipitants, il donne donc une valeur minimum des anticorps présents.

qu'il fallait utiliser cinq fois plus de globules rouges chargés en polyoside pour éliminer les anticorps agglutinant les globules que pour éliminer les précipitines. Ceci signifie soit que les anticorps antipolyosidiques non précipitables sont beaucoup plus nombreux que les anticorps précipitables, soit qu'ils correspondent à des motifs antigéniques beaucoup plus rares dans le polyoside. La première hypothèse semble peu vraisemblable, étant donné le faible taux en hémagglutinines (1/800) restant après élimination des précipitines. Notre polyoside n'étant pas homogène, nous ne pouvons savoir si ces « motifs » différents sont portés par des fractions différentes ou par une même molécule.

L'élimination complète des anticorps d'un sérum est d'autant plus intéressante qu'il semble que la liaison de l'antigène à l'anticorps soit assez fragile dans les complexes solubles. L'expérience montre en effet (fig. 2, p. 621) que le taux d'agglutination n'est pas modifié en présence d'un grand excès de polyoside acide ou alcalin ne permettant la formation que de complexes solubles. Au cours des essais d'inhibition du pouvoir agglutinant d'un sérum il faudra donc se méfier des erreurs d'interprétation qui pourront provenir de la dissociation des complexes antigènes-anticorps solubles susceptibles de se dissocier en présence de l'antigène situé à la surface des corps microbiens.

3° *Agglutinines typhiques de cheval et de lapin.* — Puisque l'absorption des sérums de cheval par le polyoside, fixé sur les globules rouges, élimine les agglutinines, on peut en conclure que, dans ces sérums, les agglutinines antityphiques sont toutes des antipolyosides.

Puisque l'absorption des sérums de lapin par le même polyoside fixé sur les globules rouges n'élimine pas les agglutinines typhiques, on peut penser que, pour cette espèce, il y a, parmi les agglutinines, des anticorps qui sont spécifiques de motifs antigéniques présents sur le germe, autres que ceux de notre polyoside.

Cette différence entre les anticorps élaborés par les deux espèces animales après injection des mêmes germes, se retrouve lorsqu'on étudie leurs courbes de précipitation par l'agglutinogène total (antigène de Boivin) et par les deux polyosides acide et alcalin. Pour le sérum de cheval (fig. 4), le polyoside alcalin précipite les mêmes anticorps que l'agglutinogène qui précipite, on le sait (Cf. fig. 1, p. 621), toutes les agglutinines. Pour le sérum de lapin au contraire (fig. 5), le polyoside alcalin précipite beaucoup moins d'anticorps que l'agglutinogène.

Deux questions se posent alors :

1° Puisque les mêmes anticorps du sérum de cheval sont précipités par l'agglutinogène de Boivin et par le polyoside alcalin, comment se fait-il que leur élimination par le premier supprime

quasi complètement les agglutinines, alors que l'élimination des anticorps, précipitant par le polyoside en solution, laisse encore un taux significatif d'agglutinines ?

2° A quel antigène autre que le polyoside « alcalin » correspondent les agglutinines des sérums de lapin ?

La réponse à la première question peut être que la quantité d'anticorps responsable de l'hémagglutination à 1/800 est trop faible pour être appréciée dans les dosages au microkjeldahl. Si, en effet, le taux d'hémagglutinines est proportionnel à la teneur en anticorps, la baisse de 1/25 000 à 1/800 que l'on observe après élimination des précipitines correspondrait à une perte de 29/30 des anticorps. Puisque le sérum contient 250 μ g d'azote (par demi-centimètre cube) précipitables par l'antigène de Boivin (courbe A, fig. 4), le polyoside alcalin ne précipiterait que

$$\frac{29 \times 250}{30} = 242 \mu\text{g.}$$

La différence est tout à fait de l'ordre des erreurs expérimentales et passerait inaperçue dans l'étude des courbes de précipitation.

A la deuxième question il est impossible de répondre pour le moment. L'agglutinogène de Boivin est une grosse molécule glucido-protéido-lipidique. Les motifs antigéniques inconnus, distincts de notre polyoside « alcalin », sont-ils de nature protéidique ? C'est ce qu'ont pensé Takeda et Kurizuka [14]. Malheureusement leur hypothèse s'appuie sur des expériences où la fraction protéinique est probablement contaminée par une forte proportion de polyoside.

S'agit-il encore d'autres groupements polyosidiques présents dans la grosse molécule de l'agglutinogène et absents des débris que nous en obtenons par hydrolyse alcaline ? Rien ne nous permet actuellement de l'affirmer (11).

Dire que nous ignorons la nature chimique des antigènes auxquels correspondent les agglutinines des sérums de lapin, c'est avouer notre ignorance sur la nature des antigènes O du tableau de White-Kauffmann, établi en utilisant des sérums de lapin.

A la question que nous nous sommes posée au début de ce travail, nous pouvons répondre :

La spécificité des antigènes I, IX, XII du tableau de White-Kauffmann n'est pas déterminée uniquement par les polyosides extraits des germes par hydrolyse alcaline et acide ; d'autres motifs

(11) Nous avons pu inhiber spécifiquement l'agglutination d'un sérum de lapin avec des quantités considérables du polyoside (0,8 mg pour 1 cm³ sérum 1/100) préparé par Lüderitz et Westphal [7 bis], mais les quantités nécessaires font penser à l'activité de quelque impureté, présente en trop faible quantité dans la préparation pour être décelable par l'analyse chimique ou physico-chimique.

antigéniques en sont responsables, dont nous ignorons actuellement la nature.

RÉSUMÉ.

1° Il n'y a pas de parallélisme entre le taux en agglutinines de plusieurs sérums de lapin et leur teneur en anticorps précipitant le polyoside, extrait des germes par hydrolyse acétique. L'élimination des anticorps précipitant ce même polyoside ne fait que peu baisser le taux en agglutinines des sérums.

2° L'hydrolyse alcaline des germes permet d'obtenir un polyoside qui se fixe sur les globules rouges, contrairement au précédent. Les anticorps des sérums antityphiques, précipitant ce polyoside, agglutinent les globules rouges sur lesquels il est fixé, mais l'élimination de ces anticorps précipitants laisse subsister des anticorps non précipitants capables d'agglutiner les globules chargés. Il est possible d'éliminer tous les anticorps (précipitants ou non) homologues de ce polyoside en les absorbant par le polyoside fixé sur les globules.

3° L'élimination de tous les anticorps antipolyosidiques (par absorption sur le polyoside fixé sur les globules) supprime toutes les agglutinines des sérums antityphiques de *cheval*. Cette même élimination laisse inchangé, ou ne fait que peu baisser, le titre en agglutinines des sérums antityphiques de *lapin*.

4° Au cours de la discussion, on a évoqué la nécessité de la présence de certains groupements sur les polyosides pour leur permettre de se fixer sur les globules rouges. On a souligné l'intérêt d'utiliser les antigènes fixés sur un support insoluble pour toute étude immunologique. Enfin on a cherché ce que les faits expérimentaux relatés dans ce travail apportaient à nos connaissances sur la nature chimique des agglutinogènes typhiques.

Nous tenons à remercier M^{me} Lallu et M^{lle} Leluc, pour leur collaboration technique au cours de ce travail, le D^r Le Minor pour le don de quelques sérums antityphiques de lapin, et le D^r Lüderitz pour l'échantillon de polyoside qu'il nous a aimablement envoyé. Les critiques du D^r Guibert nous ont été précieuses au cours de la rédaction du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] O. BIER, P. CORVAZIER et M. LANDY. Observations inédites, in [4].
- [2 a] S. V. BOYDEN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1950, **73**, 289.
- [2 b] S. V. BOYDEN et P. GRABAR. Ces *Annales*, (en préparation).
- [3] G. C. FREEMAN. *Biochem. J.*, 1942, **36**, 240.
- [4] P. GRABAR. *Colloque d'Immunochimie de Bordeaux. J. Méd. Bordeaux*, 1953, **130**, 323.
- [5] P. GRABAR et J. OUDIN. Ces *Annales*, 1947, **73**, 627.
- [6] M. HEIDELBERGER et E. F. KENDALL. *J. exp. Med.*, 1932, **55**, 555.

- [7] E. A. KABAT et M. M. MAYER. *Experimental Immunochemistry*, Thomas, U.S.A., 1948.
- [7 bis] O. LUDERITZ et O. WESTPHAL. Communication personnelle et *Zeit. Naturforsch.*, 1952, **7**, 536.
- [8] J. MÜNZ. *O Hospital*, 1950, 199, 617 et 685, in [4].
S. FISHER et E. KEOGH. *Nature*, 1950, **165**, 248, in [4].
- [9] G. MIDDLEBROOK et R. J. DUBOS. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 521.
- [10] E. NETER, N. J. ZALEWSKI et D. A. ZAK. *J. Immun.*, 1953, **71**, 145.
- [11] G. PON et A. M. STAUB. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 1132.
- [12] G. SCHRAMM, O. WESTPHAL et O. LÜDERITZ. *Zeitschr. Naturforsch.*, 1952, **7**, 594.
- [13] A. M. STAUB et R. COMBES. *Ces Annales*, 1951, **80**, 21.
- [14] Y. TAKEDA et K. KURIZUKA. *Jap. J. exp. Med.*, 1952, **22**, 267.
- [15] Y. C. THOMAS et A. T. MENNIE. *Lancet*, 1950, **259**, 745.

SUR UN CAS TUNISIEN DE MYCOSE GÉNÉRALISÉE MORTELLE

par C. VERMEIL, A. GORDEEFF et N. HADDAD (*).

(Institut Pasteur de Tunis et Hôpital Ch.-Nicolle.)

I. — OBSERVATION.

Nous rappelons brièvement l'observation clinique de ce cas, observation publiée déjà par les D^{rs} Broc (1) et Haddad et qui a fait l'objet d'une étude approfondie dans la thèse de l'un d'entre nous.

La malade, L. BT. AR..., âgée de 25 ans environ, entre à l'Hôpital Ch.-Nicolle de Tunis en mars 1951 pour tuberculose pulmonaire. Elle vient de la région minière du Sud tunisien. Elle est en très mauvais état général, maigre, pâle et très fébrile ; elle présente des signes fonctionnels importants : dyspnée, toux, expectoration abondante, douleur thoracique gauche. Sur la radiographie, le poumon gauche apparaît opaque sauf au sommet où existent des clartés circonscrites très suspectes. Et cependant les bacilloscopies répétées restent négatives. Le D^r Broc pratique alors une bronchoscopie et découvre une obstruction de la bronche souche gauche par une tumeur polylobée, lisse et régulière.

Cette constatation est le prélude à d'autres prélèvements qui permettent :

1° Une reperméation partielle mais évidente du poumon gauche qui s'éclaire mieux.

2° L'établissement du diagnostic, car l'examen anatomo-pathologique de la tumeur permet à l'un d'entre nous de conclure : « Tissu de granulation riche en leucocytes et en éléments macrophagiques géants ; de nombreuses cellules géantes contiennent dans leur protoplasme un ou plusieurs parasites qui se présentent sous la forme de grains encapsulés entourés d'une coque. Ces parasites sont très nombreux sur la préparation. Donc : granulome réactionnel au contact d'un élément parasitaire ; pas de lésion tumorale maligne. »

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 février 1954.

(1) Que nous tenons à remercier ici de son aimable courtoisie.

3° L'isolement, à partir d'un fragment de la masse tumorale, de la forme mycosique filamenteuse du parasite présumé responsable de la maladie et qui sera finalement étiqueté *Blastomyces dermatitidis* Gilchrist et Stokes.

Au reste, d'autres éléments apparaissent qui font que l'on considère la maladie, non plus comme localisée au système broncho-pulmonaire, mais comme une maladie généralisée. En effet, à partir du mois de mai, on note l'apparition :

1° De « gommages » sous-cutanées douloureuses siégeant à la face, sur le crâne et sur le sternum. A deux reprises, les ponctions à deux endroits différents et à trois mois d'intervalle donnent un pus blanc jaunâtre où s'observent de nombreux éléments de la phase levuroïde du parasite, à l'exclusion de tous germes bactériens. La culture du pus permet d'obtenir la forme filamenteuse comme on l'avait trouvée au niveau de la tumeur bronchique.

2° De lacunes osseuses à développement progressif sur la voûte crânienne et d'un épaississement de la partie moyenne de la clavicule droite.

En septembre survient une fracture spontanée de la clavicule droite. La ponction au foyer de fracture, faite, comme toujours au cours de cette observation, en multipliant les précautions d'asepsie, permet encore d'observer les mêmes formes de la phase levuroïde et d'obtenir à partir de celles-ci les mêmes formes filamenteuses du champignon initial.

Précisons que :

a) Les crachats pas plus que les produits extraits par tubages ne présentent et ne présenteront de bacilles de Koch ;

b) Les examens sérologiques (B. W.) répétés sont négatifs ;

c) Le sang périphérique ne présente aucune anomalie ; le myélogramme contient (D^r Morel, de Lyon) quelques « figures kystiques » certainement semblables aux éléments levuriformes observés dans les autres foyers (ponction sternale faite à distance du foyer abcédé) ; il n'existe pas d'adénopathie locale ou à distance.

La malade meurt six mois après son admission, quinze mois après le début présumé de la maladie. Elle n'a réagi à aucun des antibiotiques utilisés soit isolément, soit en conjugaison (pénicilline, streptomycine, auréomycine, sulfamidés). Les iodures, très mal tolérés, durent être supprimés, les diamidines coïncident avec la chute thermique terminale.

L'autopsie, limitée, permet pourtant de voir qu'il existait un bloc intrathoracique liant les organes à la cage thoracique, et de prélever des fragments de poumon, de foie, de rate et de sternum. Le parenchyme pulmonaire et la moelle sternale furent les seuls à présenter des éléments levuroïdes.

A noter que le mari et le fils (6 ans) de cette malade furent l'objet d'examen cliniques et radiologiques négatifs.

★★

Ce syndrome paraît bien entrer dans le cadre des mycoses généralisées mortelles et plus particulièrement se rattacher à la « Systemic Blastomycosis » (2) des auteurs nord-américains, cas particulier de la maladie de Gilchrist.

L'agent en cause dans le cas présent, que nous appellerons, faute de mieux, *Blastomyces dermatitidis*, a bien montré :

— une phase levuriforme parasitaire *in vivo* ;

— une phase saprophytique filamenteuse facilement obtenue sur les milieux usuels de mycologie.

La phase levuriforme a été trouvée du vivant de la malade : dans la tumeur bronchique, dans le contenu d'abcès sous-cutanés fermés, dans le foyer d'une fracture spontanée de la clavicule droite.

La phase filamenteuse a été isolée par ensemencement de prélèvements faits au niveau de ces mêmes foyers.

Notons que les manifestations cutanées n'ont jamais revêtu la forme ulcéreuse chronique, mais seulement la forme d'abcès multiples chroniques dont un seul s'est fistulisé spontanément.

II. — DONNÉES MORPHOLOGIQUES CONCERNANT LE CHAMPIGNON ISOLÉ (3).

1° ASPECT MACROSCOPIQUE DES COLONIES SUR MILIEU GÉLOSÉ GLUCOSÉ 2 P. 100. — A 22° les colonies se développent lentement, leur couleur chamois clair au début fonce par la suite.

Une colonie constituée présente les caractéristiques suivantes : il existe une zone centrale marquée par une région plus ou moins ombiliquée, couverte de mèches ; autour de cette formation s'étend une masse humide, tomenteuse et qui peut rayonner des plis irréguliers d'aspect souvent prurigineux et de couleur typiquement chamois.

Une zone filamenteuse occupe le pourtour de la colonie et pénètre à l'intérieur de la gélose.

Sur leur périphérie les colonies peuvent présenter des zones

(2) Il est bien entendu que nous employons cette dénomination faute de mieux ; le terme de « Blastomycose » doit être réservé aux levures vraies.

(3) Nous tenons particulièrement à remercier M. Segretain, chef du Service de Mycologie de l'Institut Pasteur de Paris, pour les précieuses indications qu'il a bien voulu nous donner à propos de l'étude de notre souche.

poudreuses blanchâtres tendant à envahir au moins partiellement la colonie, mais qui bruniront en vieillissant, surtout sur les milieux privés de sucre.

Dans la profondeur de la gélose une pigmentation brune se forme.

L'utilisation de divers milieux (taux de glucose augmenté ou diminué, carotte, pomme de terre, etc.) ne donne pas de variations bien nettes de l'allure des colonies.

2° ASPECT MICROSCOPIQUE DES COLONIES. — Des filaments très fins et très ramifiés occupent la périphérie de la colonie. La zone centrale, surtout quand elle affecte une allure très contournée, cérébriforme, présente une prédominance de gros éléments arrondis à paroi peu épaisse, le plus souvent vides. Ces éléments d'allure nettement vésiculeuse sont groupés en chapelet et réunis entre eux par des éléments mycéliens parfois très courts.

Au centre même de la colonie, comme dans la zone périphérique, la filamentation aérienne révèle l'existence de petites spores d'environ 4 μ , rondes et à paroi bien marquée, réunies au mycélium, le plus souvent vide de protoplasme, par un fin tractus peu visible. Sur un même tractus on peut trouver 2 ou 3 spores en chapelet réunies entre elles par un court élément filamenteux.

Dans la zone moyenne de couleur typiquement chamois, tous les intermédiaires entre la grosse vésicule et la petite spore sont trouvés.

★★

Il est donc difficile d'appeler phialide (si susceptible de réduction que soit cet élément) le fin tractus porteur de spores et par là de classer notre champignon parmi les Aspergillacées.

Considérant sa morphologie *in vivo*, il mérite donc, ne serait-ce qu'à titre provisoire, de recevoir l'appellation à peu près universellement admise dans pareil cas de *Blastomyces dermatitidis*.

Les méthodes zymographiques et auxanographiques, habituellement utilisées pour l'étude des agents des levures vraies, appliquées à notre souche, sont restées sans résultats. Notons qu'il nous a été facile de retourner à la forme levure en ensemençant la forme filamenteuse sur milieux au sang à 37° et sur membrane chorio-allantoïde d'embryon de poulet (4). Dans ce dernier cas on obtient des images qui rappellent de façon frappante les éléments trouvés chez la malade.

(4) Lesensemencements sur membrane chorio-allantoïde d'embryon de poulet ont été pratiqués dans le Service du Dr Maurin, que nous tenons à remercier bien vivement.

III. — INOCULATION AUX ANIMAUX.

A. MÉTHODE ET MATÉRIEL. — Nous avons cherché :

1° A étudier la sensibilité de certains animaux à l'infection provoquée par notre souche. Peut-être, de l'étude de cette sensibilité, pourrions-nous dégager des arguments épidémiologiques.

2° A déterminer le mode d'inoculation permettant de reproduire les lésions observées chez notre malade.

Nous donnerons brièvement les premiers résultats de ces investigations en insistant sur le caractère encore partiel de ces données (5).

Nous avons utilisé surtout des rongeurs de la faune nord-africaine, nombreux dans le Sud tunisien, tels que *Meriones shawi* L. et *Gerbillus hirtipes* L. Les rongeurs utilisés appartiennent aux élevages de l'Institut. Notre élevage de *Gerbillus hirtipes* provient de rongeurs capturés dans le Sahara libyen par l'un d'entre nous, ces rongeurs se reproduisant aisément en captivité.

Les voies d'inoculation utilisées sont les suivantes :

Chez le *mérion* : intrapéritonéale, sous-cutanée, intracérébrale, respiratoire avec anesthésie.

Chez la *gerbille* : intrapéritonéale.

Nous donnerons ultérieurement les résultats obtenus par les modes d'inoculation intratesticulaire, intracardiaque, intrathoracique, intrasternale, conjonctivale et par scarifications cutanées.

Le matériel d'inoculation provient de colonies âgées d'environ un mois de notre souche, obtenues sur milieu glucosé 2 p. 100, peptoné 1 p. 100 et émulsionnées au 1/10 dans du sérum physiologique. La souche utilisée provient d'une culture pure du pus d'un abcès fermé de la malade.

Chez les animaux inoculés la mort spontanée peut survenir, mais en général ils sont sacrifiés à une date déterminée.

Au cours des autopsies ont été pratiqués :

Des prélèvements d'organes ;

Des étalements à partir du pus des foyers infectieux, pour y retrouver les formes parasitaires ;

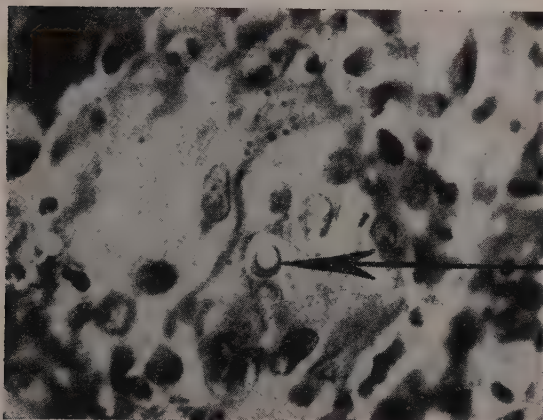
Desensemencements de ce pus sur milieux appropriés pour retrouver la forme filamenteuse du champignon.

B. ASPECT MACROSCOPIQUE DES LÉSIONS. — Nous tirons un protocole type de l'autopsie des mérions et de la gerbille inoculés par voie péritonéale, autopsie la plus spectaculaire.

Les muscles de la paroi abdominale sont parsemés sur leur

(5) Le Dr Gordeeff donnera ultérieurement un exposé anatomo-pathologique complet de cette question.

GRANULOME BRONCHIQUE



ÉLÉMENTS
LEVURIFORMES
INTRACELLULAIRES

630 X

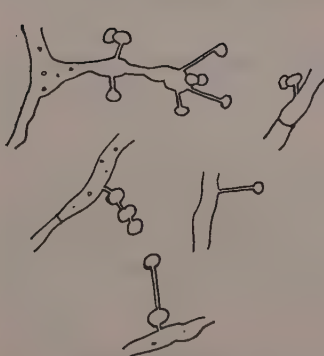
Microphotographie D^r HUET

PHASE LEVURIFORME *IN-VIVO*

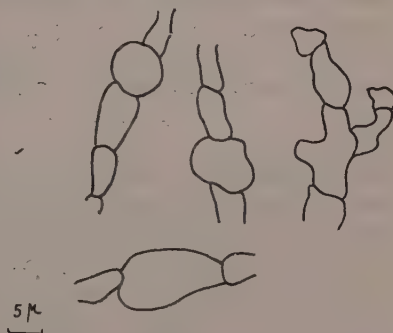
REPRODUCTION PAR BOURGEONNEMENT



PHASE FILAMENTEUSE *IN-VITRO*



APPAREIL CONIDIEN



THALLE VÉSICULEUX

face péritonéale de petites taches blanc jaunâtre, la séreuse péritonéale est épaissie et rétractée, elle s'agglomère en forme de croissant entre l'estomac et la rate. Le mésentère est infarci dans sa presque totalité. Le péritoine pelvien est incrusté de petits nodules semblables à des grains de semoule.

La surface péritonéale du côlon est parsemée des mêmes grains ; il existe quelques abcès corticaux sur le foie ; la rate est très augmentée de volume (de trois à cinq fois), foncée et friable : les poumons, adhérents au diaphragme, sont cloutés de grains jaunâtres clairs.

C. ASPECT MICROSCOPIQUE DES LÉSIONS. — *Généralités.* — Les tissus répondent à cette agression mycosique par une réaction directe au contact d'un élément levuriforme. Cette réaction évolue en plusieurs temps : le parasite détermine d'abord une réaction inflammatoire à cellules polymorphes de type granulomateux. Suivant l'intensité de cette agression, la réaction seconde revêtira soit le type cellulaire macrophagique (le follicule pseudo-tuberculeux), soit le type nécrotique (le tubercule).

Lésions granulomateuses. — Elles se présentent sous forme d'un nodule à cellules polymorphes, fibroblastes, fibrocytes, histiocytes, lymphocytes et polynucléaires.

Lésions folliculaires. — Elles sont comparables au follicule tuberculeux ; elles sont formées de cellules de type épithélioïde pouvant fusionner pour donner naissance à des cellules géantes.

Tubercules. — Ils sont constitués par un centre formé d'une masse nécrotique purulente et par une périphérie faite d'une couche de cellules épithélioïdes doublée à l'extérieur d'une réaction cellulaire polymorphe granulomateuse.

Aspect de la phase parasitaire in vivo. — La cellule levuriforme trouvée dans les tissus des animaux sacrifiés est d'environ 20 μ . L'hématéine-éosine-safran révèle une portion centrale se colorant en rouge brun. Cette portion peut avoir un aspect granuleux ou homogène ou même paraître optiquement vide, vacuolaire, aplatie ou en croissant. La capsule très réfringente, épaisse, est souvent irrégulière ; elle peut même présenter une structure en bulbe d'oignon.

Cette cellule va produire un ou plusieurs bourgeons largement rattachés à la cellule mère et cela selon deux modes : le plus fréquemment, le bourgeon s'individualise à l'intérieur de la capsule mère qui s'étranglera ensuite entre les deux éléments ; plus rarement la capsule se rompt, ses bords s'éversent et le bourgeon est émis.

Cette forme parasitaire loge à l'intérieur des cellules histiocytaires épithélioïdes, le plus souvent accolée au noyau.

D. RÉSULTATS SUIVANT LES DIVERS ANIMAUX ET LES DIVERSES VOIES D'INOCULATION. — 1° Chez *Meriones shawi* :

a) *Voie péritonéale* : 5 mérions sont inoculés chacun avec 1 cm³ d'émulsion de culture au 1/10 et sacrifiés à intervalles déterminés. Lorsqu'on permet à la maladie de se prolonger, on constate une dépilation et un amaigrissement marqués, les animaux meurent parfois au bout de quelques mois.

Tous révèlent à l'autopsie une constellation de nodules disséminés sur les organes abdominaux avec un abcès au point d'inoculation. Le pus de ces nodules contient des éléments levuriformes ; ensemencé il nous redonne toujours la forme filamenteuse. L'examen histologique de ces lésions montre des images péritonéales granulomateuses ou folliculaires contenant toutes des éléments levuriformes.

DIVERS ORGANES ayant des lésions	MÉRION SACRIFIÉ APRÈS				
	15 jours	1 mois	1 mois 1/2	3 mois	5 mois
Rate	+	+	+	+	0
Foie	+	+	+	0	0
Poumon	+	+	+	0	0
	Sans f. levur.	Sans f. levur.			
Rein	+	0	0	0	0
Pancréas	+	0	0	0	0

+ , lésions spécifiques avec présence d'éléments levuriformes ; 0, absence de lésions spécifiques et d'éléments levuriformes.

Chez les 3 premiers mérions sacrifiés, l'urine et le sang mis en culture sont restés stériles.

Deux autres mérions ont été inoculés dans le péritoine avec le pus d'un abcès provoqué chez un autre mérion par la forme filamenteuse de notre souche.

L'un d'eux s'est montré porteur de lésions spécifiques contenant des éléments levuriformes.

b) *Voie sous-cutanée* : 4 mérions sont inoculés chacun avec 0,5 cm³ d'émulsion. Les 3 premiers ont été sacrifiés de quinze en quinze jours, le dernier à un mois et demi. A l'autopsie, ils présentent tous, au point d'inoculation, un nodule avec centre nécrotique purulent. Ce pus ensemencé donne toujours la forme filamenteuse du champignon. Chez les 4 animaux, l'examen histologique révèle au point d'inoculation l'existence d'une tumeur inflammatoire avec centre abcédé et réaction cellulaire périphérique dans laquelle on note la présence de nombreuses formes

levuroïdes. Au niveau des autres viscères, il n'existe que des lésions inflammatoires banales. Seul l'animal sacrifié au bout de quinze jours présente en outre au niveau du péritoine des lésions spécifiques et dans un ganglion mésentérique un follicule centré par un élément levuriforme.

La aussi l'ensemencement du sang et de l'urine des animaux est resté stérile.

c) *Voie intracérébrale* : 4 animaux sont inoculés avec 0.08 cm³ d'émulsion. L'un d'entre eux est mort du fait de l'inoculation ; les 3 autres sont morts spontanément de quatre à onze jours après le début de l'expérience.

Les lésions (nodules ou abcès riches en éléments levuriformes) observées au niveau du cerveau de ces 4 animaux sont soit localisées au niveau des ventricules latéraux, soit disséminées dans la substance cérébrale ou les méninges.

Seul l'animal mort au bout de onze jours présente une généralisation avec lésions granulomateuses au niveau du péritoine, du poumon, de la rate, du foie, avec présence dans ce dernier organe d'éléments levuriformes.

d) *Voie respiratoire* : 3 animaux sont soumis sous éthérification légère à une instillation nasale de V gouttes d'émulsion.

Un des animaux meurt spontanément quinze jours après l'instillation, les 2 autres sont sacrifiés un mois et demi et trois mois après le début de l'expérience.

Tous trois présentent des lésions spécifiques à localisations pulmonaires et des lésions inflammatoires banales au niveau des autres organes.

Le cas le plus intéressant est celui de l'animal mort spontanément et qui a reproduit les lésions bronchiques et pulmonaires humaines. On y trouve de nombreux éléments levuriformes englobés dans des tubercules situés en général au contact d'une bronche. La paroi bronchique est ulcérée et sa lumière comblée par un tissu granulomateux contenant les éléments parasitaires. Les deux lobes pulmonaires sont porteurs de semblables formations, les autres organes sont indemnes de lésions spécifiques. Cet animal présentait de plus une pyélonéphrite ascendante probablement microbienne.

2° Chez *Gerbillus hirtipes* :

La voie péritonéale est utilisée chez deux animaux à raison de 0,75 cm³ d'émulsion chacun. Nous n'avons encore les résultats anatomo-pathologiques que d'un seul, qui présente à l'autopsie une constellation de nodules de taille variable, disséminés sur les organes abdominaux et thoraciques.

L'examen histologique révèle une atteinte de tous les organes (poumons, cœur, foie, pancréas, rate, utérus, rein), le cerveau excepté. Cette atteinte se traduit par une réaction folliculaire avec

cellules géantes multiples contenant de nombreux éléments levuriformes.

Cet animal semblerait plus sensible encore que le mérion.

★ ★

Nous pouvons donc dire que l'inoculation de la phase filamenteuse de notre souche, quels que soient la voie et l'animal utilisés, détermine l'apparition de lésions histologiques spécifiques. Ces lésions contiennent la phase parasitaire levuriforme. Il existe cependant des cas où le parasite reste invisible, malgré une recherche attentive.

Nous voulons insister sur le fait qu'une modification du terrain (dans le cas particulier d'un mérion inoculé par voie respiratoire et présentant à l'autopsie une pyélonéphrite ascendante probablement microbienne en plus des lésions mycosiques) nous a permis d'obtenir la réalisation expérimentale fidèle des lésions observées à l'autopsie de la malade.

★ ★

Nous croyons être les premiers en Tunisie à réunir les arguments cliniques, mycologiques et expérimentaux qui nous permettent d'affirmer que notre cas appartient à la « Systemic Blastomycosis » telle que l'entendent les auteurs nord-américains. Trois cas ont été publiés dans la Régence sous l'appellation de blastomycose. Les deux premiers se rapportent à des formes uniquement cutanées de levurose vraie, si l'on en croit l'étude poussée qu'en ont faite les auteurs, et sont bien, de ce fait, d'authentiques blastomycoses.

Quant au 3^e cas (Anderson et coll.), toujours uniquement cutané, l'agent isolé, *Mycoderma brocianum* P permet de le ranger dans les géotrichoses.

RÉSUMÉ.

Les arguments cliniques, l'observation mycologique des tissus et des cultures, l'expérimentation sur des rongeurs nord-africains, nous invitent à rattacher notre observation à la « Systemic Blastomycosis » telle que l'entendent les auteurs nord-américains.

BIBLIOGRAPHIE (6)

C. ANDERSON, J. COLAS-BELCOUR et R. BROG. *Arch. Ins. Past. Tunis*, 1930, 316.

R. BROG et N. HADDAD. *Bull. et Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1952, 679.

(6) Restreinte volontairement aux travaux tunisiens.

- A. CONOR et A. BRUCH. *Bull. Soc. Pat. Exot.*, 1911, 366.
A. CONOR. *Arch. Ins. Past. Tunis*, 1912, 215.
A. CONOR et C. MARCHETTI. *Arch. Ins. Past. Tunis*, 1913, 201.
N. HADDAD. *Mycose viscérale métastatique mortelle*. Thèse de Médecine,
Lyon, 1952.

ACTIONS COMPARÉES DE LA CHALEUR ET DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE SUR LES ANTIGÈNES DE *SALMONELLA PARATYPHI* C (*)

P. VIGNAIS, E. BARBU, Ph. DANIEL, et M. MACHEBOEUF (+).

(Institut Pasteur.)

Depuis ces dix dernières années, les hautes pressions hydrostatiques ont été largement utilisées dans le domaine de la biochimie. On a spécialement étudié leur influence sur des substances extraites des tissus animaux, telles que les protéines. Il était intéressant de rechercher leur action sur les macromolécules à l'intérieur des cellules vivantes. Or, les cellules microbiennes constituent un matériel de travail dont la manipulation est relativement aisée ; d'autre part, des modifications même légères, dans leur équipement antigénique, peuvent facilement être analysées par les voies de l'immunochimie ; il était enfin possible d'espérer que des microbes tués par pression seraient susceptibles de posséder un certain pouvoir vaccinant.

Nous avons étudié les modifications antigéniques d'une entérobactérie : *Salmonella paratyphi* C Vi⁺⁺. Cette bactérie possède en effet un édifice antigénique bien connu et son inoculation à la souris déclenche, chez cette dernière, un syndrome toxi-infectieux dont l'évolution peut être comparée à celle de l'infection éberthienne chez l'homme. D'ailleurs, *Salmonella paratyphi* C possède parmi ses antigènes l'antigène Vi, complexe glyco-lipopolypeptidique sérologiquement identique à l'antigène Vi du bacille d'Eberth. De nombreuses controverses se sont déroulées sur les fonctions de cet antigène. Nous avons constaté qu'il ne subissait guère d'altérations sous certaines conditions de pression. Nous verrons, par la suite, quelles conclusions en tirer.

PRINCIPE D'UNE EXPÉRIENCE TYPE.

La suspension microbienne est introduite dans un tube de verre surmonté d'un tube de gomme para pure non vulcanisée qu'on ferme par écrasement dans une pince à mors plats. La partie en

(*) Manuscrit reçu le 22 décembre 1953.

gomme du récipient assure la transmission de la pression hydrostatique (1).

Nous avons mis en œuvre des pressions de valeurs différentes :

L'une de 1 500 kg/cm², pendant seize heures à 37° C ;

L'autre de 5 000 kg/cm² pendant trente minutes à 37° C.

Ces pressions inhibent toute prolifération bactérienne ultérieure.

Des expériences comparatives ont été effectuées avec des germes tués par chauffage à 57° C pendant une heure à la pression atmosphérique (vaccin classique chauffé).

I. — MODIFICATIONS DES PROPRIÉTÉS AGGLUTINOGENES.

Après avoir été soumis pendant seize heures à une pression de 1 500 kg/cm², les suspensions de *S. paratyphi* C sont encore agglutinables par du sérum anti-Vi et par du sérum anti-H (c, 1-5). Cependant, au contact du sérum anti-O, les bactéries présentent une agglutination notable ; il semble donc que, dans ces conditions, une certaine fraction de l'antigène Vi se soit détachée de la surface du microbe.

Par contre, une compression de 5 000 kg/cm² pendant trente minutes conserve intact le pouvoir agglutinant Vi, mais fait disparaître le pouvoir agglutinant H.

Enfin, le chauffage pendant une heure, à une température de 57° C, ne diminue pas l'agglutinabilité H, mais altère profondément l'agglutinabilité Vi. D'ailleurs, l'altération de l'antigène Vi par la chaleur est un fait admis actuellement [1].

II. — MODIFICATIONS DU POUVOIR ANTIGÈNE.

Pour confirmer les résultats fournis par la méthode d'agglutination sur lame, nous avons recherché les taux d'anticorps agglutinants dans le sérum de lapin immunisé avec des suspensions de salmonelles diversement traitées.

Nous avons pratiqué deux séries d'expériences : dans la première, on injectait au lapin des suspensions microbiennes qui avaient été soumises à une pression de 5 000 kg/cm² pendant trente minutes ; dans la seconde, on utilisait des germes comprimés à 1 500 kg/cm² pendant seize heures.

Des épreuves comparatives ont été effectuées avec des germes tués par chauffage à 57° C, à la pression atmosphérique.

Première série d'expériences. — Un bouillon de culture de dix-huit heures (37° C) de *S. paratyphi* C est comprimé à 5 000 kg/cm² pendant trente minutes. Après compression, le mélange est centri-

(1) Nous remercions J. Basset qui a mis ses presses à notre disposition.

fugé. Les corps microbiens sont remis en suspension dans de l'eau physiologique (8,5 p. 1 000 de ClNa).

Notons que les germes sont centrifugés après la compression. Ce protocole particulier de préparation de vaccin pressé nous servira à mettre en évidence l'action immunisante des antigènes qui restent attachés aux corps microbiens.

Pour les deux vaccins, vaccin pressé et chauffé, les suspensions microbiennes contenaient 620.10^6 germes/ml. Elles furent injectées par voie intraveineuse, à intervalle de cinq jours, aux doses suivantes :

Première injection 0,5 ml
Deuxième injection. 1 ml
Troisième injection. 1 ml

Sur des prises de sang faites quatre, seize et trente jours après la première injection, on recherche le taux d'anticorps élaborés (tableau I).

TABLEAU I (*).

Vaccin	Lapins	Avant toute injection			4 jours après 1ère injection			16 jours après 1ère injection			30 jours après 1ère injection		
		O	H	Vi	O	H	Vi	O	H	Vi	O	H	Vi
CHAUFFÉ	1	25	<25	<25	40	40	20	2560	1280	640	2560	640	160
	2	25	<25	<25	50	50	50	2560	2560	20	2560	640	20
	3	25	<25	<25				2560	640	320	1280	640	320
	4	25	<25	<25	40	40	20	10240	1280	320	1280	640	640
	Moyenne	25	<25	<25	40	40	20	4480	1500	325	1280	640	285
PRESSÉ	5	25	<25	<25	320	20	20	320	20	2560	40	20	640
	6	25	<25	<25	320	20	20	10240	20	5120	2560	20	1280
	7	25	<25	<25	160	20	20	5120	20	5120	1280	20	1280
	Moyenne	25	<25	<25	270	20	20	5230	20	4300	1300	20	1070

(*) Agglutination H : On utilise une suspension de *S. para C* préalablement formolée. L'agglutination est lue après un séjour de deux heures à 37° C.

Agglutination O : La suspension de *S. para C* employée est préalablement traitée à l'alcool. L'agglutination est lue après un séjour de deux heures à 37° C, puis de dix-huit heures à la température du laboratoire.

Agglutination Vi : Elle nécessite une suspension bactérienne contenant un antigène Vi sérologiquement identique à celui de *S. para C*, mais des antigènes O et H différents : nous avons choisi une souche d'*Escherichia coli* (*E. coli* 1) qui possède cet antigène Vi. Les tubes sont laissés deux heures à l'épreuve à 37° C, puis dix-huit heures à la température du laboratoire (**).

Les chiffres du tableau représentant les dilutions les plus élevées pour lesquelles il existe encore une agglutination.

(**) Nous remercions M. Le Minor, Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur, qui nous a fourni les suspensions nécessaires aux épreuves d'agglutination.

En somme, l'élaboration des anticorps anti-O est très importante et évolue de façon parallèle chez des lapins immunisés soit avec le vaccin chauffé, soit avec le vaccin pressé. L'antigène O de

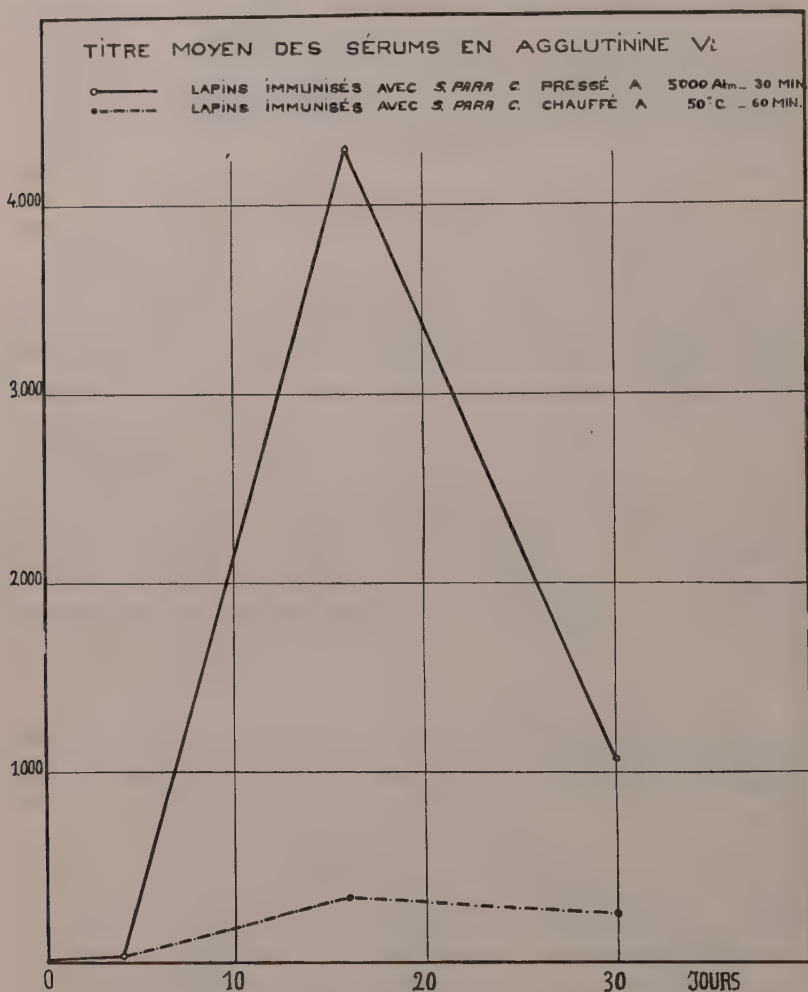


FIG. 1.

S. paratyphi C reste donc inaltéré, après chauffage à 57°C pendant une heure ou compression à 5 000 kg/cm² à 37°C pendant trente minutes.

Par contre, la production des anticorps anti-H et anti-Vi varie considérablement dans les deux lots de lapins. Chez les lapins

immunisés avec le vaccin pressé, le taux d'anticorps anti-Vi s'accroît considérablement, tandis que la production d'anticorps anti-H reste pratiquement nulle. On constate le phénomène inverse chez les lapins immunisés avec le vaccin chauffé.

Ces derniers résultats confirment les données préliminaires sur les modifications des propriétés agglutinogènes H et Vi par chauffage ou compression.

Deuxième série d'expériences. — Nous avons vu précédemment que le pouvoir agglutinogène Vi des germes comprimés à 1 500 kg/cm² pendant seize heures était légèrement altéré. Il était permis de penser à la perte d'une certaine fraction d'antigène Vi. Cette fraction s'était peut-être détachée de la surface du microbe et passée en solution. Il était intéressant de rechercher si, sous cet état, l'antigène Vi parviendrait à faire naître un taux d'anticorps aussi élevé que dans le cas où il reste intégralement sur l'enveloppe du microbe (cas, par exemple, de *S. paratyphi* C comprimé à 5 000 k/cm²).

Pour tenter de résoudre ce problème, nous avons adopté un nouveau protocole expérimental : nous avons centrifugé préalablement le bouillon de culture ; les germes recueillis puis remis en suspension dans l'eau physiologique sont alors soumis à la compression. Ils constituent, sous cette forme, le vaccin d'expérimentation. Ainsi nous injectons à la fois microbes et surnageant avec les fractions antigéniques qui ont pu passer en solution pendant la compression.

Deux lots de lapins ont été immunisés, l'un avec le vaccin pressé à 1 500 kg/cm², l'autre avec le vaccin classique chauffé.

Dans cette expérience, la densité microbienne est de

TABLEAU II.

Vaccin	Lapins	Avant toute injection			5 jours après 1ère injection			15 jours après 1ère injection			20 jours après 1ère injection			25 jours après 1ère injection			30 jours après 1ère injection		
		H	O	Vi	H	O	Vi	H	O	Vi	H	O	Vi	H	O	Vi	H	O	Vi
CHAUFFÉ	1	<20	<20	<20	<20	40	20	50	3200	100	100	3200	100	100	3200	100	200	1600	50
	2	<20	<20	<20	<20	160	20	100	1600	100	200	3200	100	400	3200	100	800	1600	100
	3	<20	<20	<20	<20	20	20	100	1600	50	200	3200	50	100	1600	50	100	1600	50
	Moyenne	<20	<20	<20	<20	90	20	80	2100	80	170	3200	80	200	2700	80	366	1600	66
PRESSÉ	1	<25	<25	<25	<20	80	40	50	1600	50	100	3200	200	200	1600	400	400	3200	400
	2	<20	<20	<20	<20	160	40	200	3200	200	400	1600	400	400	3200	400	400	3200	400
	3	<20	<20	<20	<20	40	40	200	800	100	400	1600	400	400	1600	400	400	1600	400
	Moyenne	<20	<20	<20	<20	90	40	150	1800	120	300	2100	330	330	2100	400	400	2700	400

500.10⁶ germes/ml, donc un peu moins élevée que dans l'expérience précédente. Quatre injections sont effectuées à cinq jours d'intervalle : la première de 0,5 ml, les autres

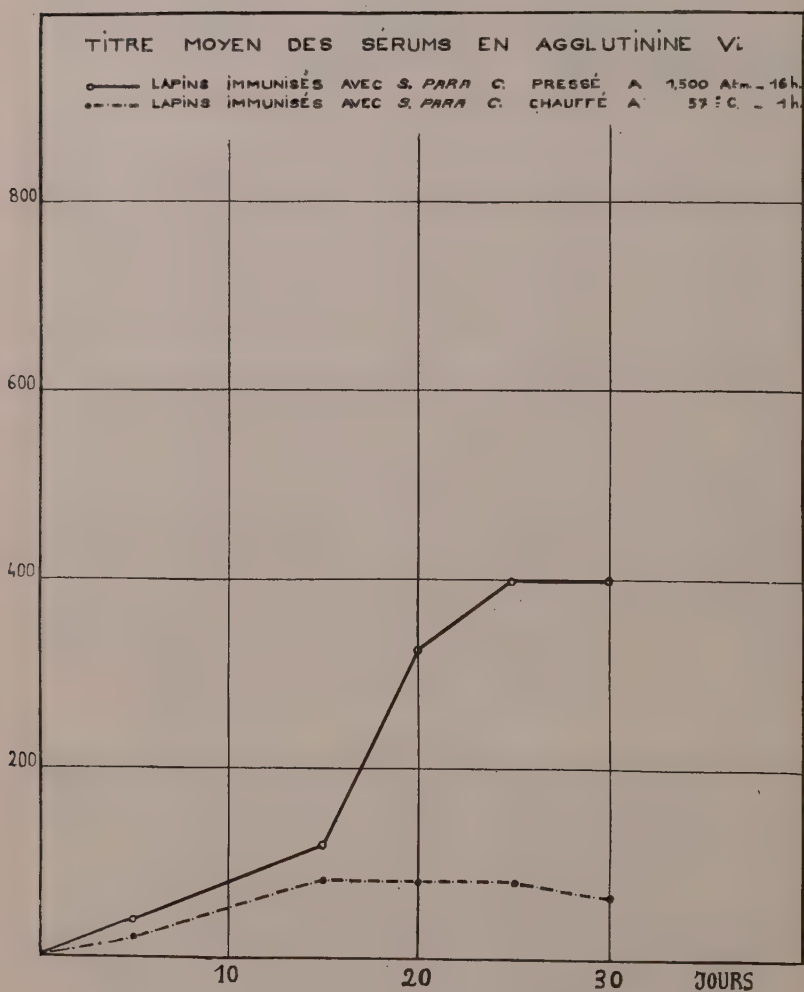


FIG. 2.

de 1 ml. Le tableau II indique les taux d'anticorps apparus cinq, quinze, vingt, vingt-cinq et trente jours après la première injection.

Ce tableau permet de constater les faits suivants :

1° La production d'anticorps anti-O et anti-H est aussi importante pour les deux lots de lapins.

2° Par contre, tandis que le taux d'anticorps anti-Vi reste très faible chez les lapins immunisés avec le vaccin chauffé, il atteint une valeur notable chez les lapins immunisés avec le vaccin pressé à 1 500 kg/cm² (fig. 2). Chez ces derniers toutefois, le taux d'anticorps anti-Vi est proportionnellement beaucoup moins élevé qu'il ne l'était dans l'expérience précédente chez des lapins immunisés avec le vaccin pressé à 5 000 kg/cm². Or, nous avons vu que le pouvoir agglutinogène Vi des germes pressés à 1 500 kg/cm² est également moins important que celui des germes pressés à 5 000 kg/cm². Il existe donc une relation entre la conservation sur les microbes de l'antigène Vi et la production d'anticorps agglutinants anti-Vi.

Nous avons schématisé les résultats généraux obtenus dans le tableau III.

TABLEAU III.

	COMPRESSION de 5 000 kg/cm ² (37° C — 30 min.)	COMPRESSION de 1 500 kg/cm ² (37° C — 16 h.)	CHAUFFAGE à 57° C — 1 h.
Agglutinabilité Vi . .	++	+	±
Agglutinabilité O . .	±	+	++
Agglutinabilité H . .	—	++	++
Production d'anticorps agglutinants Vi . .	++	+	±
Production d'anticorps agglutinants O . .	++	++	++
Production d'anticorps agglutinants H . .	—	++	++

Nous constatons donc que, soumises à une pression de 1 500 kg/cm² pendant seize heures, les bactéries conservent la totalité de leurs antigènes O et H et une partie notable de leur antigène Vi. Les salmonelles soumises à une pression de 5 000 kg/cm² pendant trente minutes perdent entièrement leurs antigènes H ; par contre, les antigènes O et Vi demeurent attachés aux corps microbiens.

On peut interpréter ces faits de la façon suivante : la disparition de l'antigène H chez les salmonelles pressées à 5 000 kg/cm² peut être le résultat du détachement des flagelles de la surface des microbes, mais aussi celui d'une dénaturation profonde de la protéine qui constitue l'essentiel de cet antigène. Les antigènes O et Vi, complexes glyco-lipo-polypeptidiques, se révèlent beaucoup plus stables vis-à-vis des hautes pressions. Toutefois, on note chez les salmonelles pressées à 1 500 kg/cm² la dispa-

rition d'une fraction de l'antigène Vi. Ce phénomène s'expliquerait par l'action de ces faibles pressions sur le comportement de certains enzymes microbiens : de telles pressions accélèrent en effet la vitesse des hydrolyses enzymatiques [2, 3]. Par contre, des pressions beaucoup plus élevées (5 000 kg/cm²) laissent intact l'antigène Vi. Ce fait est surprenant. Mais nous avons observé, par des mesures de viscosité [4], qu'à 5 000 kg/cm², les molécules d'antigène Vi en solution peuvent former des agrégats instables. On peut se demander si ces agrégats ne sont pas plus stables lorsqu'ils prennent naissance dans les microbes eux-mêmes.

En somme, la différence fondamentale, dans les trois catégories de germes, réside dans la variation des pouvoirs antigéniques H et Vi. Ce fait pouvait s'appliquer de façon intéressante à la recherche du pouvoir vaccinant.

Deux séries de vaccination ont été effectuées.

Dans la première série, nous avons immunisé, avec le vaccin chauffé à 57° C et le vaccin pressé à 5 000 kg/cm² respectivement 77 et 76 souris. Trois vaccinations ont été faites à huit jours d'intervalle, la première injection étant de 50.10⁶ germes, les deux autres de 80.10⁶ germes.

Dans la deuxième série, nous avons vacciné 71 souris avec le vaccin chauffé et 69 avec le vaccin pressé. Trois injections étaient faites également, la première injection de 80.10⁶ germes, les deux autres de 100.10⁶ germes.

Dans les deux séries d'expériences, les souris étaient infectées quinze jours après la dernière vaccination avec une dose de 2.10⁵ germes virulents.

Sur les figures 3 et 4 sont portés les pourcentages de mortalité en fonction du nombre de jours écoulés après la date de l'infection. Nous constatons que les taux de mortalité sont presque identiques chez les deux catégories de souris. La vaccination par les germes pressés est donc sensiblement du même ordre que la vaccination par les germes chauffés, peut-être légèrement supérieure. On ne peut cependant attribuer en toute certitude cette légère variation dans l'immunisation à la différence des pouvoirs antigéniques des suspensions vaccinales. Il est par conséquent probable que des facteurs antigéniques autres que les antigènes H et Vi interviennent dans la détermination de la vaccination.

RÉSUMÉ.

1° On a déterminé le pouvoir antigénique des germes tués par chauffage à 57° C pendant une heure et des germes tués par compression à 5 000 kg/cm² pendant trente minutes à 37° C et

à 1 500 kg/cm² pendant seize heures à 37° C. Il n'y a pas de variation de pouvoir antigénique O dans les diverses catégories de germes. L'antigène Vi est entièrement conservé chez les

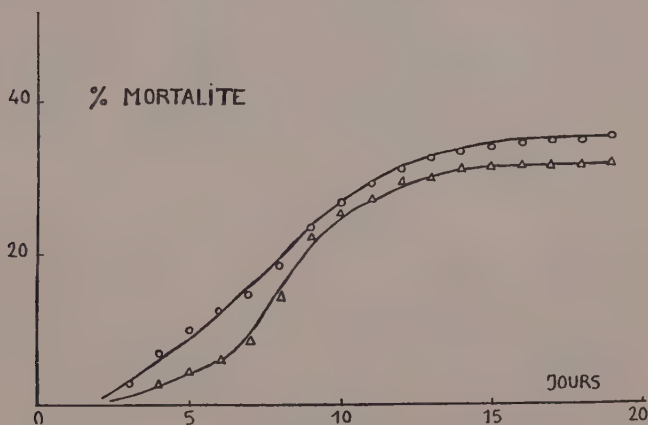


FIG. 3.

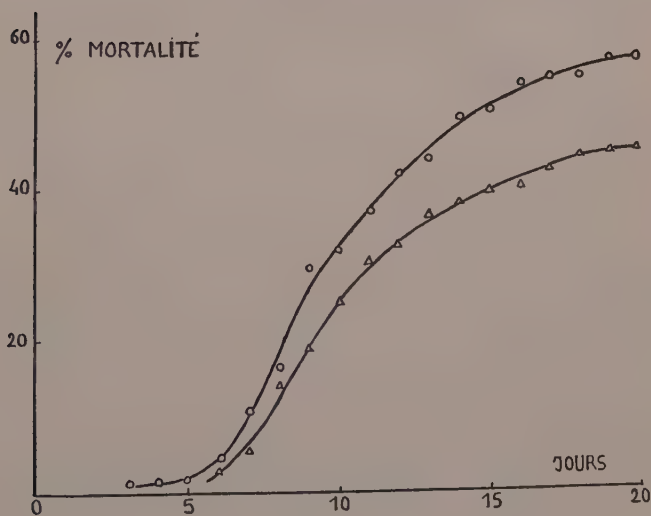


FIG. 4.

microbes pressés à 5 000 kg/cm², partiellement chez les microbes comprimés à 1 500 kg/cm². Il disparaît totalement chez les bactéries chauffées à 57° C.

L'antigène H est conservé chez les microbes tués par chauffage

à 57° ou pression à 1 500 kg/cm² ; il n'est pas possible de le mettre en évidence chez les germes tués à 5 000 kg/cm².

2° Les diverses catégories de germes tués par chauffage ou pression diffèrent donc entre elles par leur valeur relative en antigènes H ou Vi. Utilisant cette différence de pouvoir antigénique, nous avons voulu rechercher l'influence des antigènes H et Vi dans la détermination de la vaccination. En fait, l'immunisation des souris vaccinées ne peut être attribuée en toute certitude à l'un ou à l'autre de ces antigènes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. FELIX, S. S. BHATNAGAR et R. M. PITT. *J. Bact.*, 1934, **15**, 346.
- [2] G. P. TALWAR, E. BARBU, J. BASSET et M. MACHEBOEUF. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 1793.
- [3] P. VIGNAIS et M. MACHEBOEUF. *Ces Annales*, 1953 (sous presse).
- [4] P. VIGNAIS, E. BARBU, M. MACHEBOEUF et J. BASSET. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 798.

Nous tenons à remercier notre collaboratrice, M^{lle} O. Lecomte, qui a effectué les épreuves de séro-diagnostic.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 4 Mars 1954.

Présidence de M. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

COMMUNICATIONS

ACTION DES SUBSTANCES COLORANTES SUR LES MYCOBACTÉRIES

I. — COLORANTS BASIQUES. ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE LA RÉACTION

par J. DESBORDES et ETIENNE FOURNIER.

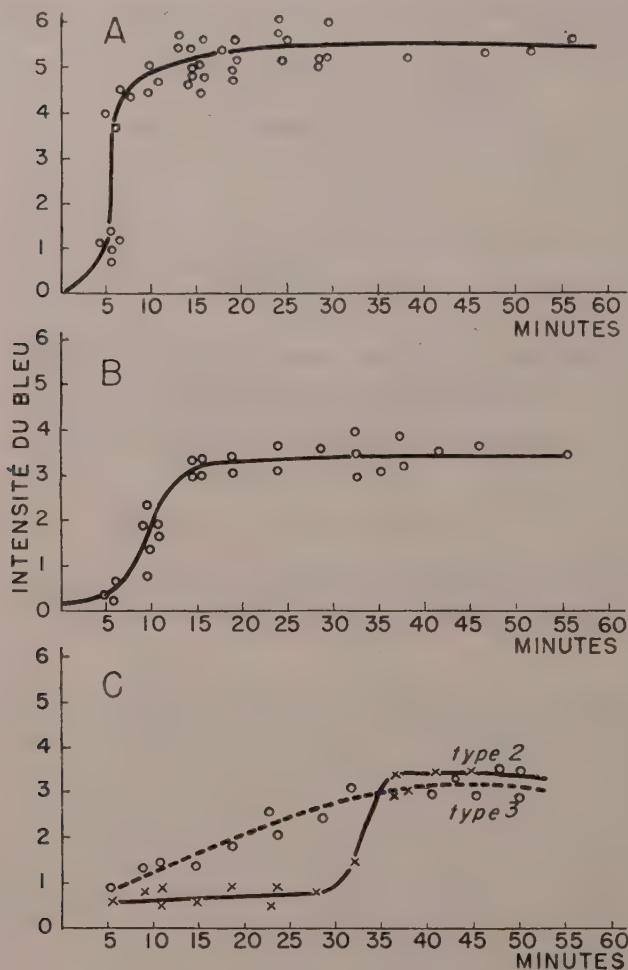
(*Laboratoire de Recherches phtisiologiques du D^r Jean PARAF, Paris,
Institut National d'Hygiène [Professeur BUGNARD].*)

Dans un précédent travail [1], nous avons souligné que l'action des substances colorantes basiques sur certains bacilles du genre *Mycobacterium* constituait une succession de phénomènes complexes [2] dont la première phase se traduisait par une adsorption d'une partie importante de la substance basique par les bactéries qui sont ainsi fortement colorées. Observant que les résultats sont variables suivant la structure du colorant d'une part et la nature des souches d'autre part, nous avons repris systématiquement cette étude en commençant par les colorants de la série dite « basique » et en utilisant des germes présentant une structure lipidique périphérique d'une certaine importance, c'est-à-dire doués de propriétés pathogènes [3].

Nous avons mis en contact, dans un tube à hémolyse, le contenu d'environ une ou deux anses de platine d'une culture arrivée à maturité (sur milieu solide type Löwenstein) d'un germe préalablement lavé à l'alcool méthylique à 50 p. 100, émulsionné dans 2 cm³ d'eau stérile avec 2 cm³ d'une solution tamponnée à un pH adapté à chacun des colorants utilisés (en général zone de demi-virage), et quelques gouttes d'une solution *très diluée* de ce colorant. Nous observons la couleur du culot bacillaire qui se rassemble, après agitation, au fond du tube, en la

comparant toutes les cinq minutes pendant une heure environ avec une échelle colorée témoin.

Nous avons utilisé les colorants basiques les plus divers : bleu de méthylène, bleu de Nil, rouge neutre, etc., et plusieurs dizaines de souches différentes de *Mycobactéries* répondant à la définition précédente.



Les résultats que nous avons obtenus sont tous superposables. En voici un exemple. L'expérience que nous rapportons ici a été menée avec du bleu de Nil en solution à 0,10 g pour 1 000 cm³, en présence d'un tampon à pH 11 (simple solution aqueuse saturée de CO₃Na₂) et les souches suivantes : *Myco. tuberc.* H37 Rv, Brévante, 10 souches isolées de pus pleuraux et exsudats divers et très virulentes pour le

cobaye, BCG, 5 souches isolées dans notre laboratoire de divers malades et peu virulentes pour le cobaye et enfin diverses souches de paratuberculeux.

Le bleu de Nil est particulièrement intéressant car, à ce pH, la solution est rose et le bacille adsorbe le colorant sous sa forme métachromatique bleue [4]. Notons qu'un germe avirulent ne serait pas coloré en bleu, mais en rose, ce qui permet une observation précise des couleurs, le bleu du culot tranchant très bien sur le rose de la solution. L'échelle comparative était la suivante, en fixant arbitrairement la gamme de 1 à 6 :

0, rose ; 1, violet rose ; 2, violine ; 3, bleu pâle ; 4, bleu net ; 5, bleu intense ; 6, bleu très intense. Les courbes suivantes résument les résultats obtenus. On y voit que tous les bacilles étudiés peuvent être classés en quatre groupes quand on examine leur comportement vis-à-vis des colorants basiques :

Premier groupe (A) : installation brutale (en cinq minutes environ) d'une coloration immédiatement intense (type observé avec la souche H37Rv).

Deuxième groupe (B) : installation retardée dans le temps, mais progressive (entre dix et vingt minutes) d'une coloration moins intense (type BCG).

Troisième groupe (C₁) : installation lente, mais progressive (entre dix et cinquante minutes) d'une coloration faible s'établissant graduellement (type souche atténuée du premier genre).

Quatrième groupe (C₂) : installation retardée après un temps de latence plus ou moins long (jusqu'à trente minutes) d'une coloration faible s'établissant brutalement en quelques minutes (type souche atténuée du deuxième genre).

Un point semble en outre intéressant à souligner : si les germes très agressifs (type H37) et le BCG forment les uns et les autres, chacun dans son groupe, des ensembles très cohérents, les germes peu virulents semblent devoir être subdivisés en plusieurs sous-groupes.

CONCLUSIONS. — Il semble donc établi que les germes du groupe *Mycobacterium* étudiés fixent énergiquement et relativement facilement les colorants basiques, mais selon des modalités différentes suivant la nature des souches. Celles-ci peuvent être classées facilement en quatre groupes : celui des souches *très virulentes* qui fixent rapidement une grande quantité de colorant basique (intensité finale entre 5 et 6), celui des souches *atténuées* qui fixent une moindre quantité de colorant (intensité finale entre 3 et 4), enfin celui des souches de *moindre virulence* qui fixent des quantités encore plus faibles (intensité finale entre 2 et 3), mais avec des modalités particulières qui soulignent l'hétérogénéité du groupe : les unes fixant lentement mais progressivement la substance, les autres ne la fixant qu'après un temps de latence assez long, mais dans ce cas la fixation retardée est brutale.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] J. DESBORDES et E. FOURNIER. Ces *Annales*, 1950, 79, 210 ; *Am. Rev. Tub.*, 1952, 66, 382.

- [2] J. DESBORDES et E. FOURNIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 1862.
[3] J. DESBORDES et E. FOURNIER. VI^e Congrès International de Microbiologie. Résumé des Communications, vol. II, p. 351, Rome, 1953.
[4] J. DESBORDES et E. FOURNIER. *La Presse Méd.*, 1952, **60**, 855.

ÉTUDES SUR LES PÉRIODES DE VIRÉMIE CHEZ LA SOURIS INOCULÉE DE VIRUS GRIPPAL

par B. FAUCONNIER et H. BEAUCHAMP.

(*Institut Pasteur, Centre National de la Grippe,
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.*)

La recherche du virus grippal dans le sang ou les organes de sujets humains ou d'animaux ayant contracté la maladie ou ayant été inoculés a été entreprise dès l'époque où l'origine virale de la grippe était démontrée.

C'est en effet en 1919, peu après la mise en évidence de l'existence de ce virus par R. Dujarric de la Rivière [1], ainsi que Nicolle et Lebaillly [2] en France, indépendamment de Selter [3] en Allemagne, que Yamanouchi et ses collaborateurs [4] au Japon montraient que la grippe pouvait donner lieu à une véritable septicémie, le sang des malades étant constamment infectant lorsqu'il est inoculé à des humains volontaires en bonne santé. Plus récemment, en 1937, Smorodintseff et Ostrovskaya [5] à Léninegrad, ainsi que Cerutti [6] en Italie, puis en 1939 Bijl et Van den Hoven van Genderen [7], ont recherché la présence du virus dans le sang et dans certains organes de la souris infectée par différentes voies. Le sang s'est révélé capable d'infecter très souvent d'autres souris saines et c'est sur l'hépatisation des poumons de ces dernières que les auteurs basaient leurs déductions. Mais, depuis, l'utilisation de l'œuf embryonné comme milieu de développement, et la réaction d'hémo-agglutination comme test de présence effective du virus grippal, ont introduit des moyens beaucoup plus précis pour détecter d'une manière sûre l'existence du virus dans le sang d'un animal infecté.

C'est à l'aide de ces techniques plus récentes que nous avons repris l'étude de la virulence du sang de la souris infectée de virus grippal, en essayant de préciser le moment de son début, de son maximum s'il y en a un, et de sa disparition si elle survient avant la mort de l'animal.

Matériel utilisé. — Virus grippal : une souche de virus grippal A-PR8 entretenue sur œuf et tuant la souris à 66 p. 100 en dix jours à la dilution de 1 p. 100.

Œufs embryonnés : des œufs incubés pendant dix à douze jours à 38° C.

Des souris blanches jeunes SW.

Technique employée. — Le virus grippal, dilué en bouillon stérile au 1/100, est inoculé par voie intra-nasale à des lots de souris anesthésiées à l'éther. Un certain nombre de souris est sacrifié périodiquement de

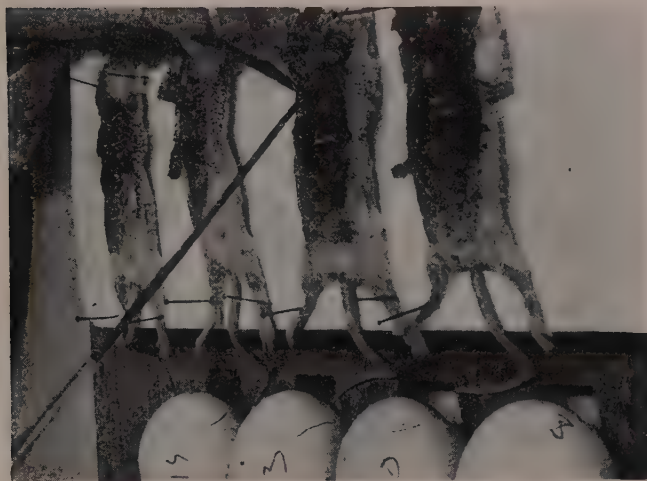


FIG. 1. — Ponction du sang au cœur de la souris.



FIG. 2. — Inoculation du sang de la souris à l'œuf homologue.

trois heures à cent trois heures après inoculation. Le cœur de chaque souris est dégagé aseptiquement et la ponction du sang total du cœur est pratiquée avec une pipette effilée stérile ; très rapidement et avant toute coagulation, tout le sang prélevé est inoculé par voie allantoïque dans un œuf embryonné préparé et la pipette est soigneusement rincée avec le liquide allantoïque aspiré et refoulé de manière à ne perdre que le moins de sang possible. Ainsi, à chaque souris correspond un œuf et l'on peut inoculer de cette façon 0,4 ml de sang total de souris (fig. 1 et fig. 2). Il importe, au cours de la manipulation, d'éviter tout contact de l'extrémité de la pipette avec d'autres organes que le cœur ; la moindre lésion du poumon peut entraîner une cause d'erreur importante.

Les œufs sont ensuite mis à l'étuve à 35° C pendant quarante-huit heures, puis chaque liquide allantoïque est prélevé individuellement et la présence du virus y est recherchée par hémagglutination.

Résultats (tableau I) : jusqu'à la huitième heure, le virus n'a pu être décelé dans le sang des souris infectées. Par contre, dès la douzième heure, 9 souris sur 16 (plus de 50 p. 100) ont présenté une virémie caractérisée. A partir de ce moment, on a toujours retrouvé un certain pourcentage de sangs virulents.

TABLEAU I.

HEURES après inoculation	NOMBRE DE SOURIS	NOMBRE D'ŒUFS infectés	POURCENTAGE d'infection	HEURES après inoculation	NOMBRE DE SOURIS	NOMBRE D'ŒUFS infectés	POURCENTAGE d'infection
3 . . .	19	0	0	31 . . .	16	2	12,5
5 . . .	19	0	0	40 . . .	17	2	11,76
8 . . .	18	0	0	45 . . .	22	6	27,27
12 . . .	16	9	56,25	48 . . .	19	5	26,31
15 . . .	20	4	20	54 . . .	30	4	13,33
17 . . .	24	3	12,5	72 . . .	16	5	31,25
20 . . .	37	6	16,21	78 . . .	16	5	31,25
24 . . .	35	6	17,14	99 . . .	16	6	37,5
26 . . .	24	9	36	103 . .	16	4	25
28 . . .	19	7	36,84				

Ce pourcentage varie de 12 à 55 p. 100 ; mais le nombre d'animaux de chaque lot est trop faible pour pouvoir affirmer d'une manière sûre que la virémie est plus fréquente à une période qu'à une autre.

Il faut aussi noter que les expériences sont faites avec une souche de virus particulièrement bien adaptée à la souris et possédant un pouvoir létal élevé pour celle-ci. Les inoculations sont faites après anesthésie à l'éther et c'est là un mode d'infection qui est loin d'être naturel.

Il est possible également que la virémie existe au delà de la cent troisième heure après inoculation. Les examens à ce moment-là n'ont pas été pratiqués.

Résumé. — Une méthode simple, permettant d'étudier les périodes de virémie chez la souris avec le minimum d'erreur, est décrite dans la présente note. Cette technique révèle une absence de virémie avant la douzième heure succédant à l'inoculation intra-nasale de virus grippal à la souris anesthésiée à l'éther. Mais à partir de ce moment et jusqu'à la cent troisième heure (dernière heure étudiée), le virus est toujours retrouvé, avec plus ou moins de fréquence, dans le sang de la souris. La souche de virus utilisée est une souche A-PR8 tuant la souris à 66 p. 100 en dix jours à la dose d'inoculation de 1/100.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE. *C. R. Acad. Sci.*, 1918, **167**, 606.
- [2] J. NICOLLE et LEBAILLY. *Ces Annales*, 1919, **33**, 395.
- [3] H. SELTER. *Deutsch. méd. Wochenschr.*, 1918, **44**, 932.
- [4] T. YAMANOUCHI, K. SAKAMI et S. IWASHIMA. *Lancet*, 1919, **1**, 971.
- [5] A. SMORODINTSEFF et S. M. OSTROVSKAYA. *J. Path. a. Bact.*, 1937, **44**, 559.
- [6] L. CERUTTI. *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 500.
- [7] BIJL et VAN DEN HOVEN VAN GENDEREN. *IV^e Congrès Intern. Path. Comp.*, 1939, **2**, 191.

VITESSE DE DÉSHYDROGÉNATION DES FORMES α ET β DES OSES : CAS DES XYLOSES

PAR JACQUES NICOLLE, YVONNE JOYEUX et JOSETTE WALLE.

(Institut Pasteur, Service des Fermentations.)

Etudiant depuis plusieurs années les rapports qui peuvent exister entre la constitution spatiale de certains corps et leurs propriétés biologiques, nous avons été amenés à considérer en particulier les antipodes optiques des oses [1, 2, 3, 4, 5]. Nous avons été conduits tout naturellement à l'étude des formes *cis* et *trans* de ces corps.

Nos investigations dans ce domaine particulier ont été poursuivies avec les formes α (*cis*) et β (*trans*) du D (+) glucose, mises en présence, soit d'un microorganisme, soit d'un enzyme attaquant le glucose. Les méthodes que nous avons utilisées sont les suivantes :

1° Par des mesures néphélométriques, correspondant à la croissance d'*Escherichia coli*, nous avons cherché s'il était possible de mettre en évidence une différence dans l'utilisation des formes α et β du glucose par ce microbe (prélevé en phase exponentielle à partir d'une culture sur glucose) ; les deux formes de ce sucre servant de source carbonée dans notre milieu synthétique habituel [6]. Les mesures sont faites, soit à l'électrophotomètre de Meunier à intervalles rapprochés (toutes les cinq minutes), soit à l'appareil enregistreur de Faguet, de façon continue.

2° Par des mesures enregistrées des variations de pH dues à la

formation d'acide lactique produit par un *Streptococcus lactis*, en présence des formes α et β du glucose.

3° Par des mesures respirométriques (réalisées au moyen de l'appareil de Warburg, correspondant à la fixation d'oxygène, par l'enzyme glucose-oxydase du *Neisseria winogradskyi*, en présence des formes précitées du glucose [7, 8].

Les conditions expérimentales les plus favorables à la réalisation des phénomènes étudiés : température à 37° C, milieu aqueux, phosphaté en général, pH 7,4, sont justement celles qui accélèrent la mutaro-

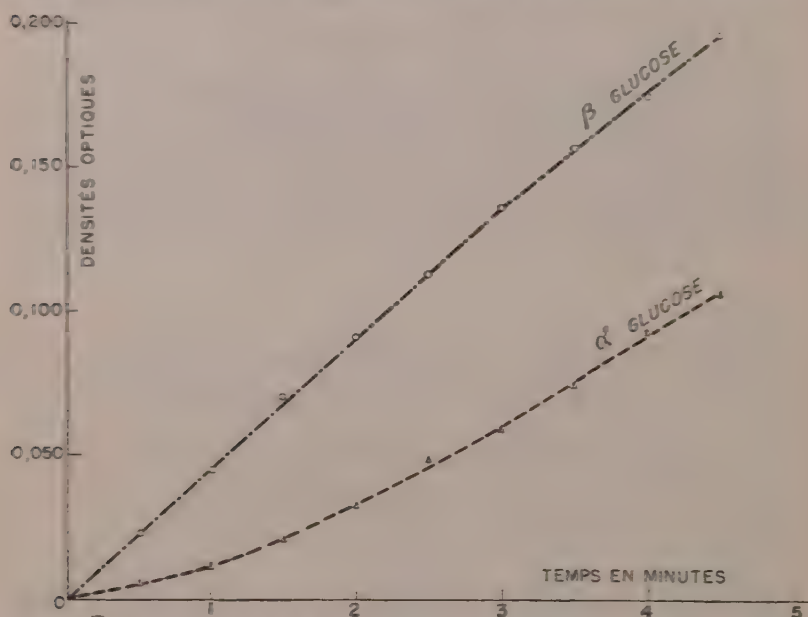


FIG. 1. — Réduction du D.P.N. par la glucose-déshydrogénase du foie en présence des α et β glucoses : 400 μ M de sucre; 0,15 μ M D.P.N.; 27 unités de déshydrogénase; tampon phosphate pH 7,4; 0,066 M; volume total 3 cm³.

lation. De ce fait, elles ne nous ont pas permis d'établir, par les méthodes précédemment décrites, s'il y avait ou non une différence dans l'utilisation des deux formes α et β du glucose.

Aussi avons-nous cherché à obtenir une réponse dans un temps beaucoup plus court et dans des conditions de température plus basse (20° C).

H. J. Strecker et S. Korkes [9], dans leur travail sur la glucose-déshydrogénase du foie, dont le coenzyme est le diphosphopyridine nucléotide, montrent, par des mesures d'absorption du DPNH₂, à 3 400 Å, au spectrophotomètre de Beckman, que la forme β du glucose est utilisée plus rapidement que la forme α .

Les auteurs préparent cet enzyme à partir du foie de bœuf; ils

signalent que les préparations purifiées sont également actives sur xylose, mais à une vitesse plus faible.

Le xylose ayant une constitution spatiale se rapprochant beaucoup de celle du glucose, il nous semblait intéressant de comparer l'action de la glucose déshydrogénase sur ces deux sucres.

Dans l'impossibilité d'obtenir la forme β du xylose, nous avons été

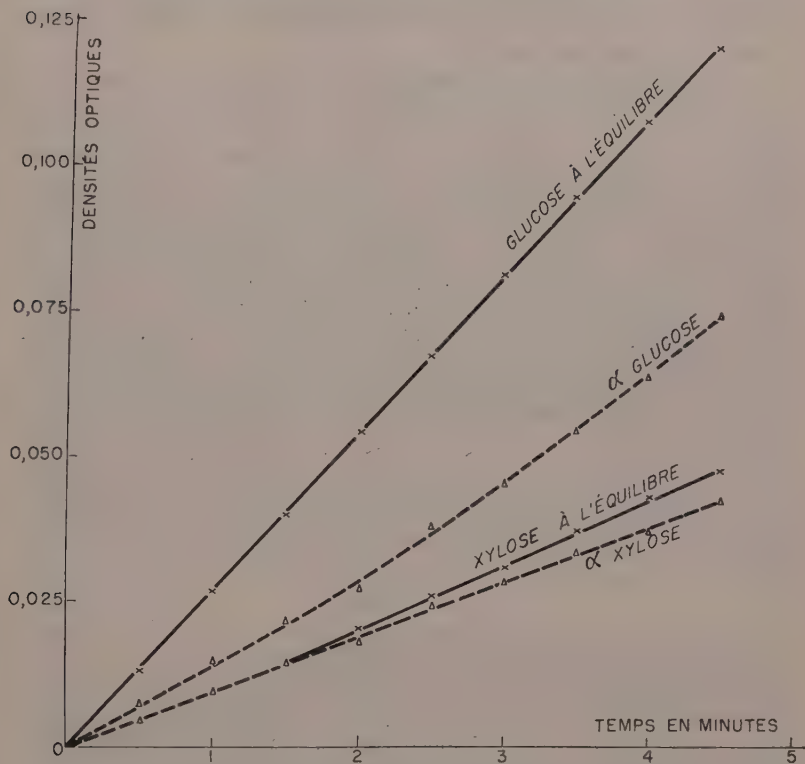


FIG. 2. — Réduction du D.P.N. par la glucose-déshydrogénase du foie en présence des glucose et xylose α et des glucose et xylose à l'équilibre : 400 μ M de sucre; 0,15 μ M D.P.N.; 27 unités de déshydrogénase; tampon phosphate pH 7,4 0,066 M; volume total 3 cm³. Glucose : moyenne de trois expériences. Xylose : moyenne de cinq expériences.

obligés de nous limiter à la comparaison des formes à l'équilibre du glucose et du xylose (correspondant pratiquement à une proportion de 65 p. 100 de l'isomère β). Les isomères α du glucose et du xylose ont été préparés par nos soins [10].

Nous avons obtenu l'extrait enzymatique de foie de bœuf suivant la technique des auteurs précités [9]. Mais après purification de l'extrait à l'acétate de plomb, nous n'avons pas retrouvé l'activité de l'enzyme sur

xylose. Afin d'étudier son action sur ce substrat, nous avons fait une préparation jusqu'au stade de précipitation acide inclus.

Après dialyse, l'extrait obtenu est centrifugé, le surnageant concentré dix fois par ventilation à $+ 5^{\circ}$ C, puis centrifugé à nouveau. L'extrait surnageant est alors utilisé pour les essais, au spectrophotomètre de Beckman. L'activité de l'enzyme sur glucose à l'équilibre est de 135 unités par centimètre cube (l'unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme causant une augmentation de la densité optique à $3\,400\text{ \AA}$ de 0,001 par minute).

Avec les formes α et β du glucose, nous avons retrouvé les mêmes résultats que H. J. Strecker et S. Korke [9] (fig. 1). Nous avons trouvé pour le glucose à l'équilibre une vitesse d'utilisation plus grande que pour la forme α , alors que dans le cas du xylose, aucune différence n'a été mise en évidence (fig. 2).

Le pouvoir rotatoire des glucose et xylose à l'équilibre est le même dans l'eau bidistillée et dans le tampon phosphate 0,066 M pH 7,4 utilisé dans nos essais, mais la vitesse de mutarotation est beaucoup plus grande dans ce tampon que dans l'eau. Il est intéressant de noter ici, que pour le glucose, en partant de la forme α , nous obtenons après trois minutes environ 78 p. 100 de cette forme, après cinq minutes 75 p. 100, après seize minutes 50 p. 100. En partant de l' α -xylose, la mutarotation est encore plus rapide ; après trois minutes, nous obtenons environ 57 p. 100 de cette forme, après cinq minutes 44 p. 100, après trois minutes trente secondes 50 p. 100.

L'activité de cette déshydrogénase étant faible sur le xylose, et, d'autre part, le fait qu'après trois minutes et demi, en partant de l' α -xylose, nous trouvons une quantité égale des isomères α et β , ne nous permettent pas d'affirmer qu'il y ait de préférence pour l'une des deux formes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. NICOLLE. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 1930.
- [2] J. NICOLLE. *C. R. Acad. Sci.*, 1944, **248**, 482.
- [3] J. NICOLLE et F. BOYER. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 338.
- [4] J. NICOLLE, Y. JOYEUX et E. BALTAZZI. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1696.
- [5] J. NICOLLE et Y. JOYEUX. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2495.
- [6] A. LWOFF, F. NITTI et M^{me} TRÉFOUËL. *Ces Annales*, 1941, **67**, 177.
- [7] M. LEMOIGNE et M. CROZON. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1075.
- [8] J. P. AUBERT, G. MILHAUD et R. GAVARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1165.
- [9] H. J. STRECKER et S. KORKE. *J. biol. Chem.*, 1952, **196**, 769.
- [10] HUDSON et DALE. *J. Am. Chem. Soc.*, 1905, **33**, 338.

A PROPOS DU POUVOIR PATHOGÈNE DE *STAPHYLOCOCCUS ASACCHAROLYTICUS* DISTASO

par A.-R. PRÉVOT et H. THOUVENOT.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

Au cours de ses recherches sur la microflore anaérobie de l'intestin humain, Distaso [1] isola en 1912 un gros staphylocoque anaérobie gazo-gène, légèrement fétide, indologène, n'attaquant aucun glucide, qu'il nomma *Staphylococcus asaccharolyticus*. Ce germe n'a été ni retrouvé, ni étudié entre 1912 et 1938, et dans les travaux d'ensemble sur les anaérobies [2, 3, 4], il était considéré comme non pathogène. Depuis 1938, huit souches ont été isolées dans le Service des Anaérobies, dont sept normales et une répondant à la variété *indolicus* de Christiansen [7].

L'étude de ces huit souches nous a permis non seulement de compléter sa description [5], mais encore d'établir les premières données sur son pouvoir pathogène spontané. Voici les circonstances de l'isolement de ces huit souches.

Souche HD2. — Isolée en 1939 dans les concrétions purulentes prélevées sur une fille de 10 ans présentant une amygdalite chronique accompagnée de troubles mentaux graves. Un vaccin réalisé avec cette souche fut injecté de façon répétée, et l'amygdalite disparut lentement. Les troubles mentaux s'atténuèrent après la guérison de l'amygdalite, puis guérirent.

Souche 265C. — Isolée en 1946 dans le pus fétide d'une pleurésie purulente en même temps que *Proteus vulgaris* et *Streptococcus pyogenes*. Le malade est mort cachectique.

Souche 266D. — Isolée en 1946 dans le pus d'une pleurésie purulente en même temps que *Streptococcus micros*. Nous n'avons eu aucun détail sur l'évolution de ce cas.

Souche 350F. — Isolée en 1948 d'un abcès du maxillaire en même temps que *Spherophorus ridiculosus*. L'infection traitée par la pénicilline guérit lentement.

Souche 534A. — Isolée en 1950 d'un abcès utérin en culture pure. Traitée par la pénicilline, l'infection guérit lentement.

Souche 600. — Isolée en 1950 d'une adénopathie axillaire suppurée, en culture pure. Nous n'avons eu aucun détail sur l'évolution de cette infection.

Souche 808A (variété *indolicus*). — Isolée en 1951 d'une mammites post-aphteuse chez une vache. Un vaccin fut réalisé avec cette souche qui amena la guérison de cette infection mammaire.

Souche 998. — Isolée en 1953 d'un abcès du cerveau où elle se trouvait en culture pure. L'antibiogramme de cette souche était : Pénicilline > Auréomycine > Chloromycétine > Terramycine (Streptomycine

inactive). Nous n'avons pas de détails sur l'évolution de cette infection.

Cette dernière souche, de beaucoup la plus typique de toutes, ne sécrétait ni toxine, ni hémolysine. L'injection de culture pure au cobaye ne produit pas de lésions très marquées, mais tous les animaux meurent dans des délais de deux à quinze jours. C'est la voie intramusculaire qui provoque les morts les plus rapides (deux à trois jours) et la voie intra-péritonéale les morts les plus lentes (deux à trois semaines). Après l'injection intramusculaire, on constate à l'autopsie une légère inflammation avec sérosité incolore et dégagement gazeux discret local. Quand l'animal tarde à mourir, il se produit toujours des complications pulmonaires par l'appel de microbes d'association.

DISCUSSION. — En négligeant volontairement les 3 cas où *Staphylococcus asaccharolyticus* a été isolé de suppurations diverses en association (pleurésies purulentes et abcès maxillaire) et où, par conséquent, son pouvoir pathogène propre peut être mis en doute, il nous reste 5 cas où ce microbe a été isolé de suppurations graves en culture pure et où l'on peut affirmer qu'il était le seul pyogène en cause : amygdalite purulente, abcès utérin, adénopathie suppurée, mammite suppurée, abcès du cerveau. La rareté des souches présentant un pouvoir pathogène expérimental (1 sur 8) place cet anaérobie dans le groupe des espèces de la microflore anaérobie endogène capables de provoquer de nombreuses infections sans qu'on puisse mettre en évidence ni le substratum, ni le mécanisme [6] de son pouvoir pathogène.

Mais l'habitat maintenant connu de cette espèce : le tube digestif et la cavité buccale, et les différentes infections d'où il a été isolé permettent de reconstituer les étapes de son extension pathogène. Partant de la bouche, il infecte l'amygdale (HD2), la cavité pleurale (265C et 266D), les espaces cellulaires de la région maxillaire (350C) et de la région axillaire (600), enfin le cerveau (998). Partant de l'intestin, il en infecte la muqueuse (colites de Distaso) et les organes génitaux (534A). Quant à la mammite suppurée de la vache, Christiansen en 1934 [7] nous en a donné la pathogénie, ayant isolé deux souches de la variété *indolicus* qui étaient douées de pouvoir pathogène expérimental en culture pure : elles provoquaient chez la souris et le cobaye une cachexie mortelle lente avec exsudat péritonéal abondant, et par injection dans les canaux galactophores de la génisse, elles provoquaient l'inflammation de la mamelle et des ganglions avec suppuration où l'on retrouve le staphylocoque anaérobie à l'état pur.

Les 3 cas où nous avons isolé cette espèce en association avec d'autres anaérobies, ou avec des aérobies, montrent enfin qu'il peut être pathogène en association. Dans ces 3 cas, les microbes associés ont probablement joué le rôle de modificateurs du terrain, ou au contraire ont bénéficié de la préparation du terrain par *Staphylococcus asaccharolyticus*.

CONCLUSION. — L'étude de huit souches de *Staphylococcus asaccharolyticus* permet de penser que cet anaérobie est un pyogène ni hémolytique, ni toxinogène, capable de provoquer, soit seul, soit en association, des amygdalites, des adénites suppurées, des abcès (en particulier abcès du cerveau) et des pleurésies purulentes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DISTASO. *Centralbl. Bakt.*, 1912, **62**, 445.
- [2] PRÉVOT. *Ann. des Sci. Nat. (Botanique)*, 1933, 211.
- [3] WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les Microbes Anaérobies*, p. 1022.
- [4] PRÉVOT. *Manuel de Classif. et de Déterm. des Anaérobies*, 1948, p. 62.
- [5] PRÉVOT et TAFFANEL. *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **436**, 451.
- [6] PRÉVOT. *Rev. Belge Path. Méd. exp.*, 1951, **21**, 67.
- [7] CHRISTIANSEN. *Acta. Path. Med. Scand.*, 1934, **48**, 42.

SPOROGENÈSE DE *STREPTOMYCES GRISEUS* EN CULTURE PROFONDE (*).

par H. PÉNAU, H. VELU et M^{lle} M. PEYRÉ.

(Laboratoires de Recherches Roussel-Sofrapen, Romainville.)

Nombre d'auteurs qui ont étudié *in vitro* l'évolution des Actinomycètes ont signalé l'existence de massues ou de formations claviformes, ces ramifications latérales, courtes, avec une extrémité renflée par rapport à la base ; aucun d'eux, sauf Duché [1] et Carvajal [2], ne semble jusqu'ici s'être particulièrement intéressé à leur signification, bien qu'on les retrouve couramment sur les microphotographies. Leur constance dans les cultures submergées, agitées ou aérées, de *Streptomyces griseus* nous a incités à reprendre le problème.

Dans ce but, nous avons suivi des cultures, soit sur lames partiellement immergées en milieu nutritif riche suivant une technique sur laquelle nous aurons l'occasion de revenir, soit dans les fermenteurs industriels :

Les examens ont été pratiqués en contraste de phase sombre, sur des éléments vivants, ou après coloration par les méthodes cytologiques utilisées pour les Eubactériales : acide tannique-crystal violet et acide chlorhydrique-Giemsa.

Nous avons pu ainsi étudier non seulement les massues et leur évolution, mais encore les deux types de spores généralement admis [3], montrer qu'ils diffèrent par le mode de formation, la morphologie et la cytologie, la germination, et souligner la diversité des types évolutifs en culture profonde.

a) **SPOROGENÈSE ET MORPHOLOGIE.** — Les massues existent aussi bien dans les cultures profondes soufflées et dans les cultures sur lames que dans les cultures sur milieux solides ; elles sont tout à fait caractéristiques : alors que le mycélium purement végétatif est, au départ, de diamètre régulier, les massues sont étranglées au niveau de leur implantation sur le mycélium qui leur a donné naissance.

A côté des massues, nous avons constamment retrouvé des formations particulières, qui existent aussi habituellement dans le mycélium aérien ;

(*) Avec le concours technique de M^{lle} Danièle Gérard.

situées à l'extrémité des filaments mycéliens, nous croyons pouvoir les assimiler aux organes sporogènes que sont les massues, sous le nom d'éléments spiciformes qui suffit à les définir.

La massue, assez courte ou très courte à l'origine, s'allonge peu à peu, en même temps qu'elle grossit. Elle peut devenir fort longue ainsi que son pédicule, et perdre alors la forme d'une massue pour devenir un gros filament ; il en est de même des éléments spiciformes ; en culture profonde, elle reste souvent courte et typique. Dans tous les cas, le cytoplasme se densifie, s'enrichit en granulations chromatiques de plus en plus grosses, assimilables à des noyaux, uniformément répartis, et devient opaque en contraste de phase ; des cloisons apparaissent peu à peu, puis s'accroissent et finissent par délimiter des spores (conidies) de taille à peu près régulière, de forme sphérique, parfois en barillet, qui s'individualisent progressivement à partir de l'extrémité des sporophores et restent associées en chaînettes plus ou moins longues, ou bien se séparent.

Il convient de faire remarquer qu'à tout moment, en culture profonde, l'évolution des massues et des éléments spiciformes peut être déviée et s'orienter vers la phase végétative ; on les voit alors donner des bourgeons tout comme les spores ou les boutures [4].

Les spores de segmentation (arthrospores ou oïdospores de certains auteurs) sont formées par simple cloisonnement d'un filament mycélien qui se divise souvent en bloc d'un bout à l'autre ; elles diffèrent totalement des conidiospores ; elles sont très polymorphes : souvent cylindriques, à bords coupés carrément, plus ou moins allongées, de taille inégale ; d'autres fois assez courtes, ovales ou presque sphériques.

b) CYTOLOGIE. — La coloration des conidiospores à l'acide chlorhydrique-Giemsa révèle des images nucléaires caractéristiques qui rappellent l'aspect morcelé et superficiel du noyau des spores de *B. cereus* et *megatherium* au repos, visible au microscope électronique sur les coupes ultra-minces [5].

Les spores de segmentation présentent dans les mêmes conditions des granulations chromatiques dont les plus importantes, au nombre de deux, sont très souvent polaires.

c) GERMINATION. — Lors de la germination, les conidiospores prennent la forme d'une larve batavique, dont le tube germinatif prolonge la pointe.

Sur les spores de segmentation, le ou les tubes germinatifs apparaissent aux angles de la spore sous forme de petits filaments d'abord droits, puis plus ou moins flexueux, comme s'il s'agissait d'un simple bourgeonnement à partir d'une bouture [4]. Un aspect caractéristique de cette germination est la forme en pipe, dont le tube germinatif, droit ou flexueux, serait le tuyau et la spore, le fourneau.

EN RÉSUMÉ. — Grâce aux cultures submergées ou sur lames, les massues et les éléments spiciformes de *Strept. griseus*, examinés en contraste de phase sombre, ainsi qu'après coloration à l'acide tannique-crystal violet et à l'acide chlorhydrique-Giemsa, nous sont apparus comme des organes sporogènes identiques. Ces sporophores donneraient des spores régulières (conidies) qui, aussi bien par leur forme que par

l'aspect de leur noyau et leur mode de germination, différent totalement des spores de segmentation (oïdiospores ou arthrospores de certains auteurs) produites par simple division du mycélium végétatif.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. DUCHÉ. *Les Actinomyces du groupe albus*. P. Lechevalier, Paris, 1934.
- [2] F. CARVAJAL. *Mycologia*, 1946, **38**, 587 et 1947, **39**, 426.
- [3] S. WAKSMAN. The Actinomycetes, *Ann. Cryptog. Phytopath.*, 1950, **9**, 50.
- [4] H. PENAU, M^{lle} M. PEYRÉ et H. VELU. *Ces Annales*, 1954, **86**, 527.
- [5] C. F. ROBINOW. *J. Bact.* 1953, **66**, 300.

**OBTENTION DE COUPES TRÈS MINCES
POUR LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE
PAR UNE MÉTHODE
UTILISANT LA DILATATION THERMIQUE.
APPLICATION A L'ÉTUDE D'ESCHERICHIA COLI**

par J. GIUNTINI et E. EDLINGER.

(Institut Pasteur.)

Dans cette note, nous allons montrer qu'on peut obtenir des coupes très minces de l'ordre de 20 à 50 μ avec un montage relativement très simple. La difficulté de réaliser de telles sections réside dans le fait du déplacement de la pièce et dans le choix du couteau. Mécaniquement, un déplacement régulier de l'ordre de 30 μ est presque impossible à obtenir, les surfaces de glissement sont difficilement définies au 1/10 de μ , les films d'huile et les tensions de friction sont du même ordre. Nous avons donc envisagé, pour effectuer nos coupes, un avancement par dilatation thermique du support de la pièce à couper, le mouvement de sectionnement étant obtenu par rotation (1). Pour réaliser ce dispositif, un petit tour de précision (fig. 1) est utilisé, le plateau portant un bloc cylindrique d'acier doux (A) de 40 mm de longueur et 20 mm de diamètre, dont la partie centrale peut être chauffée par une résistance électrique parcourue par un courant réglable fournissant une puissance de 1 à 5 watts de manière à élever au maximum la température du bloc de 10° C en dix minutes à ses extrémités, sa dilatation étant alors de 3/100 de millimètre. A ce bloc est vissée une petite pièce (B) en laiton portant le cylindre de méthacrylate de butyle polymérisé (C)

(1) Ce système se rapproche de celui utilisé par un auteur suédois, Sjöstrand [4].

contenant inclus l'objet à couper. Le couteau orientable (D) est fixé au chariot, il est taillé à 60° dans de la glace par cassure ; des essais de couteau en acier ont donné des résultats moins satisfaisants. Le sectionnement est fait à la main par rotation du plateau (E), quoiqu'on puisse utiliser le moteur avec une vitesse de rotation très lente : 60 t/m (un montage antivibratoire sur caoutchouc a été réalisé).

Les coupes de petites dimensions ($4\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ au maximum) sont recueillies une à une sur le couteau à l'aide d'un pinceau ; elles se présentent comme de minces pellicules qui, étalées sur une surface d'eau mélangée à du dioxane (à 50 p. 100), montrent par réflexion des couleurs de lames minces. On élimine les coupes visiblement trop

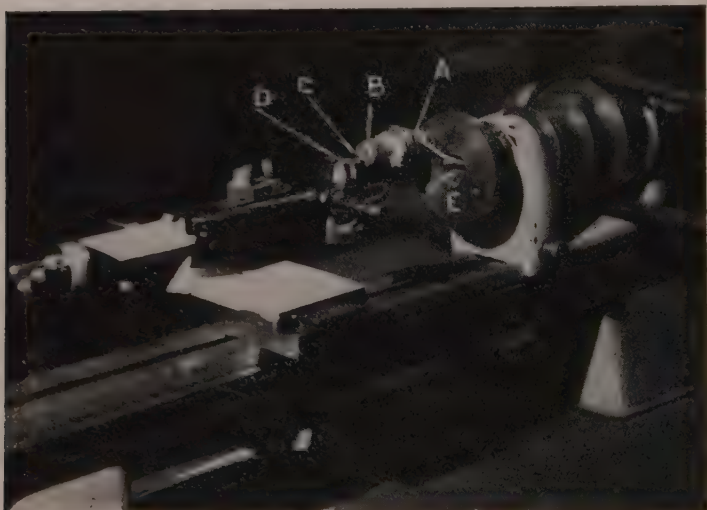


FIG. 1.

épaisses (au-dessus de $0,5\text{ }\mu$), soit celles de couleur verte et rose et celles de blanc, dit d'ordre supérieur (troisième ordre et au delà de l'échelle des teintes de Newton). Les autres sont mises sur des grilles en bronze laminé portant une membrane de formvar et examinées au microscope ordinaire pour situer les objets (microbes) ; si ces coupes semblent convenir, leur épaisseur est alors déterminée par interférométrie en nous servant d'un appareil déjà décrit dans ces *Annales* [2], qui se monte sur un microscope. Utilisant l'analyse spectrale de la lumière réfléchie (spectre cannelé), on peut évaluer facilement avec une approximation suffisante, l'épaisseur pour le point examiné. Les coupes retenues sont celles qui montrent des colorations du premier ordre (gris, bleu gris, blanc verdâtre, jaune, orangé et rouge), soit au spectroscope une cannelure brillante se déplaçant avec l'épaisseur du bleu au rouge, soit ensuite une cannelure noire ; l'épaisseur maximum admise correspond pratiquement au rouge pourpre (teinte sensible) qui

est la fin du premier ordre (cannelure noire, région de 560 m μ). Pour celle-ci, la différence de chemin optique est : $\delta = 560 \text{ m}\mu + \frac{\lambda}{2} = 2 ne + \frac{\lambda}{2}$, e étant l'épaisseur de la coupe et n son indice (1,41 pour le méthacrylate de butyle), d'où $e = 200 \text{ m}\mu$.

En fait, les coupes présentent souvent d'assez grandes différences d'épaisseur pour que même une couleur dominante pourpre violet ($e = 200 \text{ m}\mu$) puisse nous donner des parties beaucoup plus minces de l'ordre de 50 m μ , qui sont alors observables.

Après ces divers contrôles, les coupes sélectionnées sont examinées au microscope électronique, soit directement, soit après dissolution du méthacrylate dans l'acétate d'amyle (deux à trente minutes), avec ou sans légère métallisation préalable à 90°.

Comme microbe de référence, nous avons utilisé *E. coli* B. Les cultures bactériennes réalisées en eau peptonée dans le bain-marie à 37° C, avec agitation, reçoivent 2 cm³ d'une solution d'acide osmique (à 1 p. 100 en solution tampon) pour 20 cm³ du milieu quand la culture a atteint une densité d'environ 10⁸ germes par centimètre cube. Après dix minutes de fixation par l'acide osmique, on lave les bactéries en les centrifugeant deux fois à 6 000 t/m pendant dix minutes et en remplaçant le surnageant par la solution tampon (PO₄KH₂, 1,45 g ; PO₄Na₂H.2H₂O, 7,60 g et NaCl, 7 g pour 1 000 cm³ d'eau bidistillée). On remplace finalement le surnageant par de l'alcool absolu et on centrifuge trois fois à 6 000 t/m pendant six minutes (en changeant d'alcool après chaque centrifugation). On poursuit après cette déshydratation par trois lavages au méthacrylate. Il faut, après chaque centrifugation, remettre très soigneusement le culot en suspension en pipettant fréquemment ; malgré cette précaution, nous n'avons pu éviter la formation de nombreux agglomérats de bactéries, mais il restait toujours assez de cellules isolées. Le dernier culot est repris dans un mélange de huit parties de *n*-butyl et d'une partie de *n*-méthyl méthacrylate, auquel on ajoute une trace de benzoylperoxyde ; puis il est distribué dans des capsules de gélatine.

La polymérisation est effectuée dans une étuve à 55° C pendant vingt-quatre heures et achevée pendant quarante-huit heures à la température du laboratoire.

Dans certaines expériences, nous avons essayé de fixer les bactéries avec du formol, mais les coupes donnèrent des images montrant des altérations beaucoup plus grandes.

La planche hors texte montre quelques images de coupes obtenues. Ces coupes, de *E. coli*, fixées à l'acide cosmique, laissent apparaître une membrane très nette, relativement épaisse et à l'intérieur de laquelle on distingue plusieurs points assez opaques. Le reste est de densité variable, mais on peut observer plusieurs trames très fines bien délimitées. Quelquefois, la membrane semble être éclatée et dans d'autres cas l'intérieur paraît rétracté. Si les bactéries ne sont que touchées par le couteau, on n'observe qu'une structure réticulaire.

Quelle est la signification de ces images ? Il faut ici mentionner que Birch-Andersen, Maaloe et Sjöstrand [3], les seuls auteurs — à notre connaissance — qui ont coupé des *E. coli*, obtiennent des images assez

différentes des nôtres : la membrane est beaucoup plus mince, les cellules montrent une structure spongieuse plus ou moins uniforme, sauf à l'intérieur où persistent des vacuoles avec un point dense au centre. La différence pourrait s'expliquer par la plus longue période de fixation employée par ces auteurs (deux heures à 37° C). Nos images montrent une grande variété de détails, et l'interprétation semble difficile. Néanmoins, nous pensons pouvoir considérer les points denses comme des éléments d'appareil nucléaire dont la diversité correspond à l'activité pendant la phase de croissance. L'interprétation des fines trames n'est pas encore possible. S'agit-il des « mitochondries » ou des « septa » dans le cytoplasme ? Nous ne pouvons pas encore affirmer leur signification. D'autres expériences sont nécessaires, et nous pensons qu'il sera possible d'obtenir de meilleurs résultats en adoptant un temps de fixation plus court à l'acide osmique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. S. SJÖSTRAND. *Experientia*, 1953, 9, 114.
- [2] J. GIUNTINI et J. C. LEVADITI. *Ces Annales*, 1943, 69, 17.
- [3] A. BIRCH-ANDERSEN, O. MAALOE et F. S. SJÖSTRAND. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1953, 12, 395.
- [4] G. B. CHAPMAN et J. HILLIER. *J. Bact.*, 1953, 66, 362.
- [5] R. W. G. WYCKOFF, *Faraday Transact.*, 1951, 3203.

LÉGENDE DE LA PLANCHE

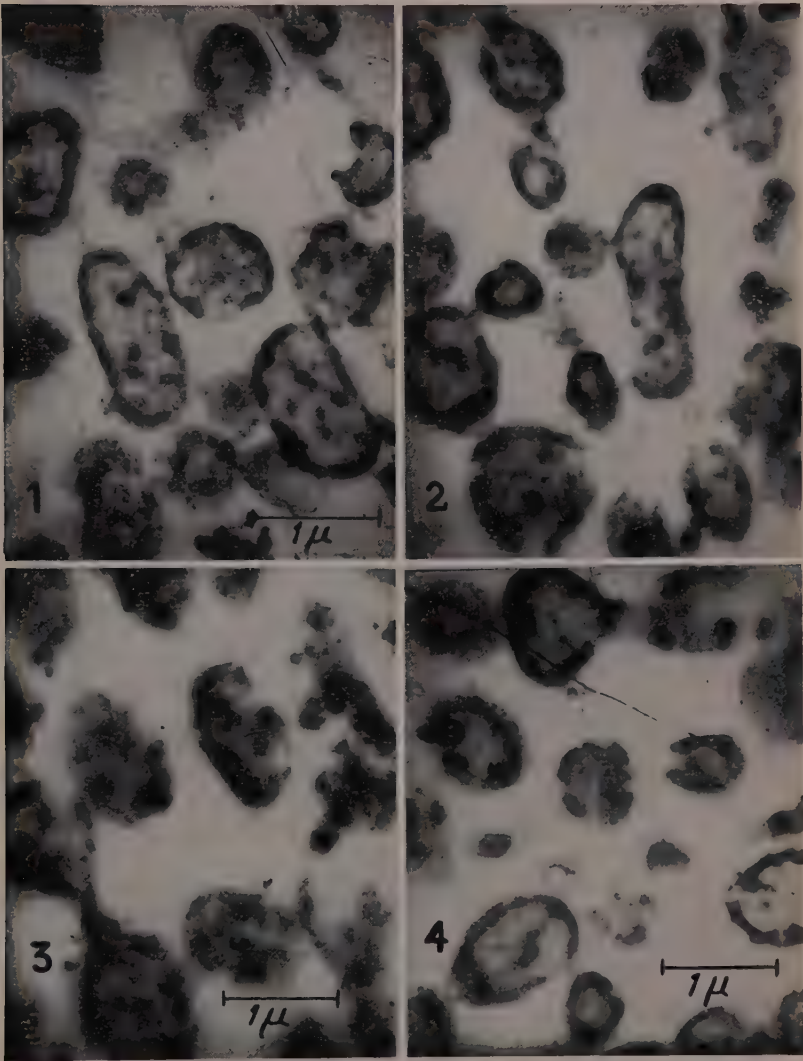
Images électroniques de sections d'*Escherichia coli* B. (Cultures en période de croissance logarithmique : 10⁸ germes au centimètre cube.) Les images 1, 2, 3, 4 sont à un grossissement direct de 15 000 × sans agrandissement photographique. La tension d'accélération des électrons est 80 000 volts.

ÉTUDE COMPARÉE DE LA RÉACTION D'IMMOBILISATION DE NELSON-MAYER ET DES RÉACTIONS DE FIXATION DU COMPLÉMENT EFFECTUÉES AVEC LES ANTIGÈNES TRÉPONÉMIQUES (SOUCHE REITER) ET LES ANTIGÈNES CARDIOLIPIDIQUES

par F. BÉNAZET, H. BROTTES, J. THIVOLET et R. SOHIER.

(Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Lyon.)

Si d'assez nombreux travaux, qui ne peuvent être tous cités ici, mais dont les plus importants sont ceux de Gaetgens [4, 2], d'Alessandro et coll. [3, 4], Gelperin [5], Puccinelli [6], Fuhner [7], ont attiré



l'attention sur l'intérêt d'effectuer le diagnostic sérologique de la syphilis avec des antigènes constitués par une suspension ou des extraits de tréponèmes, non pathogènes, dits de Reiter, la presque totalité ont utilisé comme tests de référence les réactions classiques (fixation du complément ou floculation en présence d'antigènes cardiolipidiques) et très peu ont employé la réaction d'immobilisation de Nelson-Mayer.

Nous avons rapporté, il y a quelques mois, les premiers résultats obtenus [8].

D'Alessandro et Dardanoni [9] ont, de leur côté, procédé à la même confrontation. Enfin, tout récemment, Fuhner [10], au cours d'une discussion, notait l'intérêt d'une telle étude.

Nous indiquerons ci-dessous les observations que nous a permises l'étude de 464 sérums pour lesquels nous avons mis en œuvre, en tout ou partie, les réactions sérologiques classiques de fixation du complément [Scl (1), Kolmer et Debains (2) ou, pour certains, Calmette et Massol] et de floculation [Kahn, Kline (2), et, pour certains, Meinicke], une réaction de fixation du complément effectuée avec un antigène constitué par un extrait de tréponèmes de Reiter (3), dit « Palignost » [P. R. (4)], enfin, la réaction d'immobilisation du tréponème de Nelson-Mayer [T. I. T. (5)]. Les résultats globaux sont donnés dans le tableau I.

TABLEAU I.

Réactions aux antigènes cardiolipidiques (S cl)	+	0	ou +	+	+	0	0	0					+	0	0	+
Réaction avec l'antigène "PALIGNOST" (Tréponèmes de REITER) (P.R.)	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
Test d'Immobilisation de Nelson (T.I.T.)	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+				
Nombre de sérums donnant les résultats indiqués ci-dessus	93	84	15	3	23	9	28	0	2	10	0	1	11	154	2	28
	+ : Sérologie classique partiellement ou faiblement positive															

On constatera que les trois types de réactions ont pu être mis en

(1) Lire désormais Scl : réaction dite classique de floculation et de fixation du complément avec les antigènes cardiolipidiques.

(2) Antigènes de l'Institut Pasteur, sauf pour le Calmette et Massol et le Meinicke.

(3) Obligeamment fourni par le professeur Barbieri, Directeur de l'Institut Sieroterapico Milanese Serafino Belfanti, que nous tenons à remercier très sincèrement.

(4) Lire désormais pour P. R. : réaction de fixation du complément avec l'antigène « palignost », suspension de tréponèmes de Reiter.

(5) Lire désormais pour T. I. T. : test d'immobilisation du tréponème de Nelson-Mayer.

œuvre pour 256 sérums, et deux seulement pour 208 (soit 13 avec P. R. et T. I. T. et 195 avec P. R. et Scl).

Si l'on procède à une confrontation des résultats de la réaction au Pallignost et du test d'immobilisation, on constate que pour 108 sérums donnant un T. I. T. positif, 104 ont un P. R. positif et 4 un P. R. négatif. Il s'agit (6), pour un malade, d'une syphilis sérologique très vraisemblable d'après les antécédents et les nombreuses réactions qui ont été pratiquées. Un autre malade est de race noire, un autre un enfant né d'une mère syphilitique et traitée, le quatrième un enfant sur lequel nous n'avons pu avoir de renseignements cliniques précis.

Par ailleurs, sur 161 T. I. T. négatifs, nous trouvons 117 P. R. négatifs également et 44 P. R. positifs. Dans ce dernier groupe, trouvent place des sujets appartenant à diverses catégories que nous ne pouvons indiquer que succinctement dans cette note (6). Trois étaient des syphilis récentes en cours de virage des réactions sérologiques, le T. I. T. devenant, comme on le sait, positif le dernier, 7 pour lesquels la sérologie classique était partiellement ou faiblement positive et que tout conduisait à considérer comme des réactions faussement positives avec les antigènes cardiolipidiques, 6 avaient des antécédents syphilitiques connus microbiologiques (7), cliniques (7), ou sérologiques (7). Enfin, 28 patients fournissaient un sérum qui donnait des Scl négatives, et parmi eux 26 pouvaient être considérés avec les critères qui viennent d'être rappelés comme d'anciens syphilitiques, alors que deux d'entre eux n'avaient aucun antécédent connu.

Si nous confrontons maintenant les réactions P. R. et Scl, nous constatons les faits suivants :

Pour 120 sujets, les deux réactions ou groupes de réactions, étaient positifs. Pour ces 120 sérums, le T. I. T. fournissait les réponses suivantes : 93 positifs, 16 négatifs (parmi lesquels 3 syphilis primo-secondaires en cours de virage au T. I. T.). Pour 11 sérums, le T. I. T. n'a pu être fait.

Parmi 238 patients pour lesquels les réactions Scl et P. R. étaient négatives, on vérifiait pour 84 d'entre eux que le T. I. T. était négatif et, pour 148, il s'agissait de sérums témoins prélevés chez des sujets non suspects de syphilis, enfin pour 6, la suspicion de syphilis, initialement envisagée, avait été par la suite écartée.

Enfin, dans un groupe de 39 sérums donnant une réaction P. R. positive et des réactions Scl négatives, on comptait 28 T. I. T. négatifs, 2 sérums de sujets n'ayant aucun antécédent syphilitique et 9 T. I. T. positifs.

Restent alors 4 patients dont les sérums donnaient une réaction P. R. négative et des réactions Scl partiellement positives. On comptait, par-

(6) Nous ne pouvons donner ici le détail des observations qui seront publiées dans la thèse de l'un de nous (H. Brottes, Lyon, 1954).

(7) On entendra désormais : par antécédents microbiologiques : constatation antérieure de tréponèmes dans les lésions cutanées ou muqueuses ; par antécédents cliniques : la notion de manifestations morbides contrôlées médicalement et ayant les caractères de celles dues à la syphilis ; par antécédents sérologiques : des réactions Scl et surtout T. I. T. nettement positives.

mi les 54 sérums, 3 T. I. T. positifs et 23 négatifs. Enfin, cette dernière réaction n'avait pu être pratiquée pour 28 d'entre eux.

Cette énumération, un peu fastidieuse sans doute, était nécessaire pour dégager les données pratiques éventuelles suivantes :

1° Si l'on n'avait tenu compte que de la réaction de fixation du complément effectuée en présence de suspensions de tréponèmes de Reiter (P. R.), on aurait conclu à l'existence d'une infection syphilitique actuelle ou antérieure cent quarante-huit fois et à son absence cent vingt et une fois. Or, parmi les 148 considérés comme syphilitiques, 104 l'étaient, selon toute vraisemblance, en raison de la positivité du T. I. T., 32 l'étaient ou l'avaient été en raison des antécédents microbiologiques, cliniques et de la constatation antérieure d'un T. I. T. positif. En admettant que le T. I. T. soit le test le plus fidèle, on serait conduit, dans une première approximation, à considérer que 12 sujets n'étaient pas syphilitiques, mais de ce groupe, il convient de noter, à l'avantage de la P. R., 3 sérums de syphilitiques primo-secondaires dont le T. I. T. n'était pas encore devenu positif. Seuls resteraient donc 9 malades que la P. R. effectuée seule aurait pu faire considérer à tort comme syphilitiques.

Pour les 121 patients qui, compte tenu de la seule P. R., auraient été classés parmi les non syphilitiques, 117 ayant un T. I. T. négatif, n'avaient pas, semble-t-il, été infectés par le tréponème alors que 4 dont le T. I. T. était positif, l'avaient été.

2° Si l'on avait mis en œuvre exclusivement les réactions de fixation du complément et de floculation avec les antigènes cardio-lipidiques (Scl), on aurait pu conclure à l'existence actuelle ou antérieure d'une syphilis pour 135 sujets. Mais, si parmi eux cette notion pouvait être confirmée par des critères microbiologiques, cliniques et par la positivité du T. I. T. pour 102, elle ne l'était pas pour 33 dont les Scl apparaissaient alors faussement positives.

Toujours en n'employant que les réactions Scl, on aurait considéré comme non syphilitiques 121 malades. Or, 35 l'étaient ou l'auraient été si l'on se réfère aux trois critères rappelés ci-dessus.

3° Si l'on avait effectué simultanément les réactions de fixation du complément avec comme antigène, une suspension de tréponèmes de Reiter (P. R.) et les réactions sérologiques d'hémolyse et de floculation, employant les antigènes cardiolipidiques (Scl) et si l'on avait admis la réalité d'une infection syphilitique antérieure ou actuelle, lorsque les deux réactions P. R. et Scl étaient positives, 109 malades auraient été classés parmi les syphilitiques dont 93 l'étaient et 6 l'avaient été. On aurait, par contre, écarté l'existence passée ou présente d'une infection syphilitique pour 84 patients, avec des raisons valables, semble-t-il, puisqu'il n'y avait pas d'antécédents connus et que le T. I. T. était négatif.

EN RÉSUMÉ. — Si l'on tient compte des données qui permettent d'établir avec la précision la plus grande l'existence d'une syphilis, c'est-à-dire d'une part le fait d'observer ou de savoir que l'on a constaté antérieurement des lésions ayant les caractères cliniques de celles que l'infection syphilitique détermine (avec, pour certains sujets, mise en évidence de tréponèmes) et d'autre part, la positivité de la

réaction spécifique d'immobilisation du tréponème de Nelson-Mayer que nous avons des raisons (8), avec bien d'autres, de considérer comme la plus sûre, on est conduit à admettre la supériorité des réactions de fixation du complément effectuées en présence des antigènes constitués par une suspension de tréponèmes de Reiter sur les réactions dites « classiques » de fixation du complément ou de floculation utilisant les antigènes cardiolipidiques.

Un autre fait pratique mérite d'être indiqué : la négativité constante du test d'immobilisation du tréponème de Nelson-Mayer, lorsque les deux réactions avec antigènes dits de Reiter et les antigènes cardiolipidiques sont négatives, ce qui a été noté dans 84 cas.

Si ces résultats étaient confirmés, on pourrait retenir tout l'intérêt de l'emploi des suspensions de tréponèmes de Reiter, ou de leurs extraits, comme antigènes intervenant dans les réactions sérologiques parallèlement aux réactions dites « classiques » avec les antigènes cardiolipidiques. Ce nouveau « clavier » sérologique, lorsqu'il donnerait des réponses négatives à tous les modes permettrait d'éviter la mise en œuvre du test d'immobilisation de Nelson-Mayer, qui demeure actuellement limité à quelques laboratoires spécialisés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] W. GAETGENS. *Med. Klin.*, 1929, **25**, 390.
- [2] W. GAETGENS. *Arch. Derm. Syph.*, 1937, **176**, 42.
- [3] G. D'ALESSANDRO, F. ODDO et DARDANONI. *Boll. Ist. Sierot. Milanese*, 1945, **24**, 107.
- [4] G. D'ALESSANDRO, F. ODDO et L. DARDANONI. *J. Ven. Dis. Inform.*, 1950, **31**, 314.
- [5] A. GELPERIN. *Am. J. Syph.*, 1949, **33**, 101.
- [6] V. A. PUCCINELLI. XVIII^e Congrès de la Soc. Ital. de Derm. et Syph. II. Minervo Medica, édit., Turin, 1951.
- [7] Fr. FUHNER. *Aertz. Wochenschr.*, 1952, **7**, 644.
- [8] J. THIVOLET, M. ROLLAND et R. SOHIER. VI^e Congrès International de Microbiologie, Rome, septembre 1953.
- [9] G. D'ALESSANDRO, L. DARDANONI et P. ZAFFIRO. *Expert Committee on Venereal Infections and Treponematoses* (3^e Session), Copenhague, 31 août et 5 septembre 1953.
- [10] Fr. FUHNER. Discussion à propos de la Commission de Meinicke, Assemblée de Derm. du N.-O. et de Hambourg, 5 juillet 1953 (à paraître).

Les communications suivantes paraissent ou paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Le « pouvoir anti-infectieux » chez les souris des préparations de phages activés sur « Sal. enteritidis » var. Danysz et sur « Sal. typhi murium » et ses relations avec leur « efficacité » in vitro, par R. WAHL.

(8) Déductions basées actuellement sur l'étude de 4 000 sérums.

Conditions de persistance du virus poliomyélitique dans le suc gastrique humain, par G. BARSKI, A. MACDONALD et P. SLIZEWICZ.

Caractères généraux du paludisme expérimental de la souris blanche infectée par « Plasmodium berghei », par G. FABIANI et J. ORFILA.

Développement du virus grippal et pH du liquide allantoïque.
II. Réceptivité de la membrane chorio-allantoïque à l'infection et développement du virus suivant l'âge de l'embryon et le pH du liquide allantoïque, par B. FAUCONNIER.

Recherches sur la composition antigénique des Staphylocoques non pathogènes. I. Mise en évidence d'agglutinogènes spécifiques et d'un agglutinogène commun aux souches pathogènes et non pathogènes, par J. PILLET et B. ORTA.

LIVRES REÇUS

L. C. Soula. — *Précis de Physiologie*. 2^e édit., 1 vol. 1 100 p. ; 337 fig., Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1953.

Il s'agit de la seconde édition de ce Précis, augmentée des acquisitions récentes, et en particulier de celles concernant l'utilisation des isotopes traceurs, le cholestérol et les stéroïdes, l'exploration électrique du système nerveux, etc. Le plan en est le même que celui de la première édition. L'auteur souligne qu'il n'a cherché à apporter que des faits dont la connaissance est nécessaire aux médecins et se défend de toute interprétation doctrinale.

H. T.

Courcoux, André Meyer et J.-P. Nico. — *Techniques des tuberculino-réactions et de la vaccination par le BCG*. 1 vol. 80 p. comprenant un atlas photographique de 62 pl. dont 2 en couleurs. Masson et Cie édit., Paris, 1954. Prix : 700 fr.

L'ouvrage se présente essentiellement sous la forme d'un album photographique qui, après la description de la technique de vaccination, reproduit les gestes que nécessite cette vaccination. Les figures sont accompagnées d'une légende extraite des instructions ministérielles sur les recherches de la sensibilité à la tuberculine et sur la pratique de la vaccination. Ces photographies, ainsi que les planches en couleurs, se signalent par leur qualité et la finesse de leur reproduction.

H. T.

W. D. Germer. — *Viruserkrankungen des Menschen*. 1 vol. 190 p., 47 fig., Georg Thieme édit., Stuttgart 1954. Prix : 30 DM.

Ce livre s'adresse au médecin praticien et envisage la question des virus des points de vue clinique, épidémiologique et étiologique. Après

un premier chapitre consacré à des généralités sur les virus et aux techniques de leur étude, il passe assez rapidement en revue les diverses maladies à virus de l'homme, qui sont classées en : maladies des voies respiratoires, maladies provoquant des exanthèmes, maladies du foie, du système nerveux, des muscles, des ganglions lymphatiques, de l'œil et de la peau. Outre la clinique, l'auteur envisage brièvement l'anatomie pathologique, le diagnostic de laboratoire et la thérapeutique.

H. T.

R. I. S. Bayliss. — *Practical Procedures in clinical Medicine. Biochemical and radiological investigations.* Seconde édition. 1 vol. 484 p., J. et A. Churchill édit., Londres 1954. Prix : 32 shillings.

Bien que la première édition de cet ouvrage ne remonte qu'à 1950, une seconde s'imposait, étant donné les progrès réalisés dans les méthodes de diagnostic et le traitement au cours de ces quatre années. Le texte du premier volume a été complètement révisé, de nombreux chapitres ajoutés, alors qu'on supprimait ceux qui concernaient des techniques périmées. Les méthodes décrites comprennent non seulement les interventions telles que ponction lombaire, transfusion sanguine, mais également les recherches qui font appel à la biochimie et à la radiographie.

H. T.

R. Mande. — *Manuel pratique de vaccination par le BCG.* 1 vol. publié par le Centre International de l'Enfance, 200 p., 13 pl. hors texte, Masson et Cie, édit. Paris, 1954. Prix : 950 fr.

Le but de cet ouvrage est de mettre à la portée des médecins les données essentielles concernant la vaccination par le BCG chez l'homme. C'est avant tout un ouvrage pratique, et l'auteur a réservé son exposé aux procédés adoptés dans différents pays et qui ont donné les mêmes résultats à tous ceux qui les ont utilisés. On a ainsi l'ensemble d'une expérience collective portant sur des dizaines de millions de sujets. L'ouvrage est divisé en sept chapitres. Le premier est consacré au rappel de quelques données scientifiques et immunologiques indispensables ; les suivants, aux méthodes de sélection des sujets à vacciner et aux différentes techniques de vaccination. Le dernier chapitre résume les règles essentielles de la vaccination dans la pratique médicale courante.

H. T.

Le Gérant : G. MASSON.